



Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Núcleo de Pesquisas Replicon

**ANÁLISE DO PERFIL GENÔMICO DA PERDA
AUDITIVA SENSORIONEURAL NÃO SINDRÔMICA**

Goiânia-GO
© Setembro, 2011



Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Núcleo de Pesquisas Replicon

ANÁLISE DO PERFIL GENÔMICO DA PERDA AUDITIVA SENSORIONEURAL NÃO SINDRÔMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientanda: **Luciana Alves Antonio Machado**
Orientador: Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD
Co-Orientador: Dr. Cláudio Carlos da Silva

Goiânia
Setembro, 2011

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

*Dedico este trabalho:
À minha Família,
que apóia os meus sonhos e minhas batalhas,
e, incondicionalmente, comemora minhas conquistas.*

Agradecimentos

Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois... A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor.

Francisco Cândido Xavier

Agradeço a Deus, Ser maior que me fez entender o quanto Ele é supremo, fiel e justo.

Quando ainda em dúvida do passo que daria para minha formação, tive a grata satisfação de ser apresentada a Genética por aquele que viria a ser o meu orientador. Sabia que teria um grande mestre, parceiro, mas não tinha idéia que encontraria um grande amigo, irmão, pai e algumas vezes filho. Um coração impossível de se medir. Uma força desconhecida por ele mesmo, uma pureza de alma digna de crianças. Um encantador de gente!!! Deu-me a honra de compartilhar de sua vida e de sua família. Esteve presente em todos os momentos, dedicando carinho, atenção e confiança. Com paixão, em tudo que faz, impulsionou-me, sendo o alicerce fundamental para que este trabalho fosse realizado. Obrigada **AMIGO** Dr. *Aparecido Divino da Cruz*, nosso “**Peixoto**”!

Estou certa de que existem anjos... me deparei com um sem asas, **Dr. Cláudio Carlos da Silva**, com seu jeito sereno, equilibrado e alegre, não mediu esforços para o apoio de todo trabalho. Sempre disposto a se desdobrar e atender a todos, inclusive a mim, que chegava sem avisar e era recebida sempre com um carinhoso sorriso. Suas aulas tão claras eram como um passeio, sempre envolvida em prazer. Pegou-me pelas mãos e me levou, quase sem que eu percebesse, ao mundo da genética. Conheci o verdadeiro valor de uma amizade. Agradeço, em reverência, todo seu carinho e apoio, meu amigo “**Claudinho**”.

À minha “quase” amiga de infância **Dra. Daniela de Melo e Silva**, com seu jeito elétrico de ser, transborda energia; a imensidão de seus conhecimentos, o dinamismo, a competência e a determinação parecem não caber em você. Por isso, minha admiração é ainda maior. Eternamente obrigada.

Um “grande menino” que sempre se referia a mim como “professora”, “senhora”, me mostrou ser repleto de conhecimento e capacidade. Com muita calma esclarecia minhas dúvidas e conduzia os meus caminhos. Fez-me admirá-lo e respeitá-lo a cada dia mais. Só tenho a agradecer por tudo que fez a mim e a este trabalho. **Raimundo Lima da Silva Júnior**, meu muito obrigada.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas Replicon – Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás: **Cristiano Luiz Ribeiro, Damiana Mirian da Cruz e Cunha, Eduardo Rocha Pedrosa, Emília Oliveira Alves Costa, Juliana Abreu, Rafael Cosme Machado, Thais Cidália Vieira e Gustavo Silva Pinto** pelo apoio, compreensão, amizade, dedicação e torcida constantes. Muito obrigada!

Aos meus queridos alunos, agora profissionais da Fonoaudiologia, **Jaime Gomes Silva Filho, Nayana Thaysse Araújo Muniz e Vanessa Rodrigues de Lima**, pelo carinho, compreensão, disposição, dedicação, desprendimento, amizade, parceria e torcida, minha admiração e meu obrigada do fundo do coração. “... *sem vocês eu nada seria...*”

À todos colegas de turma que participaram de cada tijolo colocado na nossa construção: obrigada.

Um especial agradecimento aos que foram mais que colegas, parceiros e amigos: **Fernanda C. Stegani, Patrícia Bonilha, Rodrigo Bernini e Junelle Paganini**. Tudo ficou mais fácil com a presença de vocês.

À minha **AMIGA** querida, de todas as horas, boas e não tão boas: **Celina K. K. Suzuki**. Dividimos o medo, a ansiedade, as dúvidas os esforços e agora só quero dividir as alegrias desta etapa concluída. Sua competência e dedicação me fazem admirá-la cada dia mais. MUITO obrigada por fazer parte da minha vida há tanto tempo, sendo sempre assim tão especial.

À amiga **Amélia Cristina Portugal**, pela parceria, carinho e apoio que sempre me fortalece e me estimula a continuar.

Às amigas e companheiras de gestão no departamento: **Liliane Teles, Yvone Portilho, Sílvia Maria Ramos e Maione Maria Miléo**, por me apoiarem e incentivarem nesta caminhada, nada fácil. Pela presença, carinho, dedicação e confiança. Não tenho palavras para agradecer!

À minha comadre, amiga, irmã, **Christiane Camargo Tanigute**, sempre presente, nos momentos mais importantes da minha vida. Sua amizade, carinho, dedicação e força me mostraram o seu verdadeiro papel em minha vida. **“Dizem que sou louco... por pensar assim, mas louco é quem me diz e não é feliz... eu sou feliz!!”**

Aos pacientes e seus familiares pela confiança depositada em mim e a presteza de seguirem comigo.

Meirevone Ribeiro de Freitas, sua presença em minha vida foi uma feliz surpresa. Obrigada por seu carinho, dedicação, atenção e amizade.

A todos os professores do Departamento de Fonoaudiologia que se mostraram firmes em me incentivar. Em especial, às amigas **Danya Ribeiro Moreira e Luciana Martins Zuliani**, que, com toda experiência e conhecimento, se colocaram à disposição, agregando valores ao meu trabalho.

Ao meu sogro **Enio Ribeiro Osório** e minha sogra **Sueli Machado Osório**, meu carinho e gratidão por entenderem minhas horas de ausência.

Aos meus cunhados, obrigada pela força e torcida!

Aos meus sobrinhos, que sempre foram amigos, companheiros e cúmplices em todas as etapas de minha vida, obrigada pela torcida e amor, sempre!

Às minhas irmãs: **Lúcia Caetano, Marilene Moreira e Mariluce Cordeiro**. Orgulho-me de tê-las ao meu lado, sempre me apoiando, torcendo por mim e vibrando com as minhas conquistas. A presença de vocês me fortaleceu e me tornou feliz. Agradeço por terem sido muito mais que irmãs... minhas “segundas” mães.

Ao meu “cunhado pai”, **João Caetano Filho**, luz em nossos caminhos. Sua dignidade, força, carinho, compreensão, apoio e amor me mostraram o caminho a trilhar. Obrigada por tudo, sempre!

Mãe **Nilce Alves Antonio**, meu maior exemplo, minha força maior! A sua presença em minha vida sempre foi essencial. Ensinou-me que as duras batalhas têm sempre o porquê e não devemos ter medo de enfrentá-las. Mulher guerreira, honesta, verdadeira, humana, forte e justa. Sempre me incentivando, acreditando em mim, levou-me à superação constante. Seu apoio, em todos os momentos de minha vida, fez a diferença. Seu amor por nós me deu tranquilidade para continuar. Obrigada por seu amor incondicional! Te amo!!!

Ao meu amor, **Marco Aurélio Machado Osório**: você entendeu as minhas faltas, se fez “pãe” para nossos filhos, me deu forças quando fraquejei. Deu-me carinho, apoio, segurança e amor, tornando essa luta possível. Minha alma gêmea, “*daqui até a eternidade*”, sempre com muito amor.

Ao meu filho, **Paulo Victor Alves Machado Osório**. Neste período vivi a tarefa de ser estudante e a alegria de ser mãe de um atleta campeão que soube sempre conciliar obrigações. Sua dedicação e amor pela natação me inspiraram a ser melhor a cada dia. Orgulho-me de ser sua mãe. Seu carinho, respeito e amor me levaram a continuar. “*Você é algo assim, é tudo pra mim, bem mais que sonhava*”. Te amo muito!

Filhote, **Luiz Eduardo Alves Machado Osório**, a sua pureza e espontaneidade me fizeram acreditar na beleza da vida, na possibilidade de um mundo melhor! Sua sensibilidade me fez renovar a cada dia. Sempre chegando com gestos e palavras que eu precisava no momento. “... *nem o perfume de todas as flores é igual à doce presença do seu amor*”. Te amo até passar do céu!!!

Lista de Abreviaturas

- BA – Bahia
- CBMEG – Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
- CGH – Hibridação Genômica Comparativa (do inglês, *Comparative Genomic Hybridization*)
- DAPI – Diamidino fenil-indol (do inglês, **4',6-diamidino-2-phenylindole**)
- DFN – *Nonsyndromic Deafness*
- DFNA – Perda Auditiva Genética Não Sindrômica Autossômica Dominante (do inglês, *Nonsyndromic Deafness, Autosomal Dominant*)
- DFNB – Perda Auditiva Genética Não Sindrômica Autossômica Recessiva (do inglês, *Nonsyndromic Deafness, Autosomal Recessive*)
- DFNX – Perda Auditiva Genética Não Sindrômica Ligada ao X (do inglês, *Nonsyndromic Deafness, X-Linked*)
- DNA – Ácido desoxirribonucléico (do inglês, *Desoxy Ribonucleic Acid*)
- EOA – Emissões Otoacústicas Evocadas
- FiSH – Hibridação Fluorescente *in situ* (do inglês, *Fluorescent in situ Hybridization*)
- FITC – Isotiocianato de Fluoresceína (do inglês, *Fluorescein Isothiocyanate*)
- HLO – *Hearing Loss Organization*
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- p – braço curto
- PA – Perda Auditiva
- PAARNS – Perda Auditiva Autossômica Recessiva não Sindrômica
- PAGNS – Perda Auditiva Genética Não Sindrômica
- PANS - Perda Auditiva Não Sindrômica
- PAS – Perda Auditiva Sindrômica
- PASN – Perda Auditiva Sensorineural
- pb – pares de base
- q – braço longo
- RS – Rio Grande do Sul
- SUS – Sistema Único de Saúde
- TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA
- TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TRITC – Isotiocianato de Tetrametilrodamina (do inglês, *Tetramethylrhodamine Isothiocyanate*)
- UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
- VDS – Sistema de Vídeo-Documentação (do inglês, *Video-documentation System*)

Lista de Quadros

Quadro I. Classificação das perdas auditivas segundo a diversidade de variáveis clínicas a elas associadas e internacionalmente reconhecidas 23

Quadro II. Principais genes e conexinas relacionados à Perda Auditiva. 33
Adaptado de Rabionet *et al*, 2002

Lista de Tabelas

Tabela I. Protocolo de hibridação dos fragmentos marcados por <i>Nick Translation</i> envolvendo a co-desnaturação em forno para lâminas	47
Tabela II. Aspectos descritivos do grupo de voluntários com perda auditiva sensorineural não Síndrômica	48
Tabela III. Imbalanços cromossômicos observados em pacientes com perda auditiva não síndrômica sensorineural	52
Tabela IV. Regiões gênicas associadas à perda auditiva que foram identificadas por CGH cromossômico em 31 pacientes com Perda Auditiva sensorineural não síndrômica, incluindo a época de manifestação da doença	53

Lista de Figuras

- Figura 1.** Cariótipo com bandeamento GTG em linfócitos T do sangue periférico de um paciente do sexo masculino (Caso n°. 2329) com perda auditiva sensorineural não sindrômica. Em [A] a metáfase e em [B] o pareamento cromossômico 49
- Figura 2.** Hibridação Genômica Comparativa Cromossômica. Em [A] metáfase resultante da composição final de cores após a captura das imagens utilizando os filtros DAPI (azul), FITC (verde) e TRITC (vermelho). As regiões destacadas em verde e vermelho representam áreas com imbalances cromossômicos. Em [B] o posicionamento dos cromossomos com o perfil cromossômico 50
- Figura 3.** Imbalances cromossômicos observados em pacientes com perda auditiva sensorineural não sindrômica. Em verde, regiões com ganhos genômicos e em vermelho, regiões cromossômicas com perdas genômicas. Os números entre parênteses representam a quantidade de cromossomos analisados 51
- Figura 4.** Perfil Linear em Barras da Hibridação Genômica Comparativa Cromossômica. Em verde, regiões com ganhos genômicos e em vermelho, regiões cromossômicas com perdas genômicas 54

Sumário	
Frontspice	Iii
Dedicatória	Iv
Agradecimentos	V
Lista de Abreviaturas	X
Lista de Quadros	Xi
Lista de Tabelas	Xii
Lista de Figuras	Xiii
Resumo	Xv
1 Referencial Teórico	17
1.1 Introdução	17
1.2 Anatomo–Fisiologia da Orelha Humana	18
1.2.1 Equilíbrio	22
1.3 Perdas Auditivas	23
1.4 Testes Genéticos na Intervenção Precoce	24
1.5 Epidemiologia das Perdas Auditivas	25
1.6 Aspectos Genéticos da Perda Auditiva	29
2 Justificativa	35
3 Objetivos	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
Capítulo I	39
1. Introdução	39
2. Material e Método	43
2.1. Grupo Amostral	43
2.2. Avaliação Audiológica	44
2.3. Obtenção das Amostras Biológicas	45
2.4. Estudo Cromossômico por Bandeamento GTG	45
2.5. Extração e Purificação do DNA	46
2.6. Hibridização Genômica Comparativa	46
3. Resultados Discutidos	48
3.1. Estatística Descritiva do Grupo Amostral	48
3.2. Achados Audiológicos	48

3.3. Padrões Cariotípicos	49
3.4. Imbalanços Cromossômicos Detectados por CGH	50
4 Considerações Finais	56
5 Bibliografia	57

Resumo

A perda auditiva é o déficit sensorial mais comum em humanos e gera alterações na estruturação da linguagem e na capacidade de comunicação oral. Uma em cada mil crianças nasce surda ou se tornará surda em diferentes graus antes que a linguagem seja adquirida, período pré-lingual. O conhecimento dos fundamentos genéticos moleculares do sistema auditivo proporcionará intervenções precoces, desenvolvimento de novas terapias, facilitação do aconselhamento genético e maior integração do indivíduo, com perda auditiva, na sociedade. Estudos genômicos poderão solidificar a geração e desenvolvimento do conhecimento técnico-científico e tecnológico na comunidade científica regional, além de garantir uma análise epidemiológico-molecular que retrate melhor a realidade dos agravos da saúde na população em Goiás. O presente estudo teve como objetivo identificar regiões cromossômicas contendo imbalances genômicos, potencialmente associados nas perdas auditivas sensorineurais não síndrômicas utilizando abordagens de citogenética molecular. Para a participação na pesquisa, amostras de sangue periférico foram obtidas de 31 pacientes da Clínica Escola de Fonoaudiologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, com perda auditiva sensorineural sem etiologia definida, com ou sem antecedentes familiares e sem características síndrômicas. Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação audiológica, seguidos de culturas de linfócitos T do sangue periférico em curto prazo, conforme os protocolos para a obtenção de cromossomos metafásicos para a avaliação cariotípica. A investigação dos imbalances cromossômicos foi realizada por CGH, utilizando o kit comercial para hibridação genômica comparativa, seguindo as recomendações do fabricante. Do grupo amostral, 45,2% (14/31) eram do sexo masculino e 54,8% (17/31) do feminino, com idade média de 19,5 anos, sendo que 54,8% citaram antecedentes familiares, 41,9% afirmaram não haver antecedentes e 3,2% não souberam informar. Todos os participantes apresentavam Perda Auditiva sensorineural variando o grau de leve a profundo, dos quais 87,1% dos indivíduos referiram perda auditiva pré-lingual e 12,9% pós-lingual. A natureza multifatorial da perda auditiva é certamente uma situação muito evidente. Contudo, os imbalances cromossômicos assumem um papel importante na gênese e desenvolvimento da doença. Deste modo, o melhor entendimento dos papéis dos fatores genéticos nos mecanismos relacionados com os processos de diferenciação celular, vem contribuir no melhor entendimento da gênese dos agravos à saúde, em especial, na perda auditiva.

Palavras-Chave: Perda Auditiva não síndrômica; CGH; Perfil genômico; Fonoaudiologia.

Abstract

Hearing loss is the most common sensory deficit in humans, which causes a negative impact in the structure of language and oral communication skills. One out of every thousand children are born deaf or become deaf to varying degrees before language is acquired, thus developing a pre-lingual deafness. Knowing the molecular genetic basis of the auditory system would provide early intervention, development of new therapies, genetic counseling and more productive social integration of individuals with hearing loss. Genomic studies would produce important information to support the development of technical, technological, and scientific tools that would help the regional community to provide better health care to the deaf . Moreover, genomic studies would ensure a molecular epidemiological analysis that portrays the reality of better health disorders in the population of Goiás. The current study was designed to identify chromosome regions containing genomic imbalances potentially associated with the non-syndromic sensorineural hearing loss using molecular cytogenetics. Peripheral blood samples were obtained from 31 patients from the Clinical School of Speech Pathology, Pontifical Catholic University of Goiás, with sensorineural hearing loss of unknown etiology, with or without family history and without a concurrent syndrome. All subjects were submitted to audiological evaluation, followed by short-term cultures of peripheral blood T lymphocytes in order to obtain metaphase chromosomes for karyotyping. Chromosomal imbalances was assessed by CGH. In the studied group, 45.2% were male and 54.8% female, mean age was 19.5 years, while 54.8% reported family history of deafness, 9% reported lack of familial history, and 3.2% could not say. All participants had sensorineural hearing loss varying from mild to severe degrees, of which 87.1% exhibited pre-lingual hearing loss and 12.9% post-lingual. The multifactorial nature of hearing loss was certainly evident. However, chromosomal imbalances played an important role in the genesis and development of the disorder. Thus, a better understanding of the roles of genetic factors in the mechanisms related to the processes of cell differentiation, contributes to better understand the genesis of health problems, especially in the field of hearing loss.

1 Referencial Teórico

Em minhas preces de todo dia, sempre peço coragem e paciência. Coragem para continuar superando as dificuldades do caminho naqueles que não me compreendem. E paciência, para não me entregar ao desânimo diante das minhas fraquezas.

Francisco Cândido Xavier

1.1 Introdução

A linguagem desempenha um papel essencial na organização perceptual, na recepção e estruturação das informações, na aprendizagem e nas interações sociais das pessoas (GATTO e TOCHETTO, 2007). Em humanos, o processo da linguagem falada requer a participação basicamente da audição e da capacidade de vocalização das pessoas. O ser humano organiza-se no seu universo, adquire conhecimento, entende o mundo, as pessoas e seus sentimentos por meio da linguagem (SILVA e LIMA, 2006). Portanto, a integridade anatomofisiológica do sistema auditivo em sua porção periférica e central é um pré-requisito à aquisição e ao desenvolvimento normal da linguagem.

Em humanos, a audição é um dos cinco sentidos básicos cuja função é captar os sons existentes no meio em que vivemos e enviá-los ao córtex cerebral, sendo um pré-requisito fundamental para o sistema de comunicação entre as pessoas. A orelha humana é responsável pela audição e equilíbrio do organismo. O órgão auditivo contém um complexo e sofisticado mecanismo de transdução de energia existente na natureza. Este mecanismo é responsável por transformar ondas sonoras em energia mecânica na orelha média, em energia hidráulica na orelha interna e, por fim, em energia bioelétrica para condução pelo nervo auditivo. Ao final do processo, o som percebido é decodificado em informação significativa, que é processada no cérebro. Neste contexto, a audição é fundamentalmente importante para a aquisição das habilidades de fala e linguagem da criança. Qualquer prejuízo ao ouvido poderá interferir no desenvolvimento global do ser humano, alterando assim a capacidade na interpretação

do mundo, no desempenho cognitivo, na adaptação social, na verbalização e na capacidade fonoarticulatória do indivíduo.

A evolução infantil depende basicamente de dois fatores: características individuais da criança – condições orgânicas e afetivas – e características do ambiente – aspectos sócio-familiares e oportunidades de aprendizagem. O desenvolvimento global: cognitivo, linguístico e emocional – será determinado pelo processo de interação dos fatores acima mencionados (ZORZI, 1993). Uma perda de audição não identificada pode ter consequências devastadoras sobre o desenvolvimento da fala e da linguagem da criança, mas também sobre seu comportamento psíquico e social (OLIVEIRA *et al.*, 2004; ROSLYNG-JENSEN, 1997).

A linguagem se desenvolve tanto no ouvinte quanto no não-ouvinte, igualmente, nos primeiros seis meses. Assim este tempo marca o momento máximo para se iniciar o tratamento. Há estudos que documentam que crianças com perda auditiva atendidas precocemente têm melhor desenvolvimento do que aquelas que recebem cuidados tardiamente (aos 2, 3 anos, por exemplo). Assistência precoce promove melhores resultados em relação à fala, linguagem, ganho escolar, auto-estima e adaptação psicossocial (COLUNGA, *et al.*, 2005; GATTO e TOCHETTO, 2007).

1.2 Anátomo-Fisiologia da Orelha Humana

Uma onda sonora é produzida por um elemento vibrador ou fonte, podendo ser desde um cristal, uma corda, um tubo, uma membrana, ou mesmo uma placa que, quando estimulado, é capaz de produzir perturbações ou variações na densidade do meio ao seu redor (RUSSO, 1999). Já o ar encontra-se em estado de equilíbrio na ausência de perturbação, ou seja, a densidade das partículas de ar permanece relativamente constante ao longo do tempo (ZEMLIN, 2000).

O som é produzido por ondas sonoras de compressão e decompressão que ocorrem alternadamente. Estas ondas sonoras propagam-se em algum meio, sejam eles sólidos, líquidos e gasosos, não havendo a possibilidade de propagação no vácuo (RUSSO, 1999). A autora afirma ainda, que o processo de propagação sonora repete-se continuamente até que seja percebida pelo órgão auditivo. Da propagação do som até a sua percepção e interpretação ocorre uma cascata sequencial de eventos transformativos de energias. Iniciando pela transformação da energia sonora, passando pela mecânica, hidráulica e finalizando com a energia bioelétrica dos impulsos nervosos que chegam ao cérebro (ZEMPLIM, 2000).

O órgão responsável pela audição é a orelha, antigamente denominada ouvido, órgão vestibulo-coclear ou estado-acústico. Conforme Russo (1999), a orelha encontra-se localizada, em sua maior parte, no osso temporal da caixa craniana e, além da função de ouvir, é também responsável pelo equilíbrio dinâmico e estático do indivíduo.

Zemlin (2000), afirma que a orelha humana é um órgão altamente sensível que nos possibilita perceber e interpretar ondas sonoras em uma extensa gama de frequências, podendo variar de 16 a 20.000 Hz, sendo dividida em três partes: orelha externa, média e interna.

Na orelha externa está localizado o pavilhão auditivo, constituído por tecido cartilaginoso recoberto por pele que tem a função de captar e canalizar as ondas sonoras para o canal auditivo e tímpano. Segundo Zemlin (2000), o meato auditivo externo é um tubo de forma curva e irregular, escavado em nosso osso temporal, que estabelece a comunicação entre a orelha média e o meio externo, com cerca de 25 mm de comprimento e 8 mm de diâmetro no adulto. É revestido internamente por pêlos e glândulas, que desempenham função de proteção e de amplificação da pressão exercida pela onda sonora.

Russo (1999) descreve que o canal auditivo externo termina numa delicada membrana denominada tímpano ou membrana timpânica. O tímpano está firmemente fixado ao conduto auditivo externo por um anel de tecido fibroso, chamado anel timpânico. Portanto, ao receber a onda sonora, a membrana timpânica se desloca para frente e para trás, transformando as vibrações sonoras em mecânicas que são comunicadas aos ossículos da orelha média.

Já a orelha média inicia-se anatomicamente na face interna da membrana timpânica e consiste, em sua totalidade, em um espaço aéreo, denominado cavidade timpânica, na região do osso temporal. Dentro dela encontram-se três ossículos articulados entre si, cujos nomes descrevem sua forma: martelo, bigorna e estribo. Esses se encontram suspensos na orelha média através de ligamentos.

Os ossículos da orelha média, segundo Zemlin (2000), funcionam como alavancas, aumentando a força das vibrações mecânicas propagadas pelo ar, agindo assim, como amplificadores das vibrações da onda sonora. O autor afirma ainda que a membrana timpânica e o sistema ossicular convertem a pressão das ondas sonoras em uma forma útil de energia. Esta mudança acontece ao encostar o cabo do martelo no tímpano; o estribo apóia-se na janela oval, que é um orifício na orelha interna que estabelece a comunicação com a orelha média. As ondas sonoras são coletadas pelo tímpano, cuja área é 22 vezes maior que a área da janela oval, ou seja, capaz de produzir uma energia 22 vezes maior que a captada e transmitida, através dos ossículos, à janela oval. Assim a pressão de movimento da base do estribo torna-se suficiente para mover o líquido coclear para frente e para trás.

A orelha média comunica-se também com a faringe, através de um canal denominado tuba auditiva, anteriormente denominada trompa de Eustáquio, que permite a entrada, permanência e circulação do ar no ouvido médio. Dessa forma, de um lado e

de outro do tímpano, a pressão do ar atmosférico é igual, e quando essas pressões se diferenciam, a audição fica comprometida até que o equilíbrio seja restabelecido (ZULIANI, 1999).

A orelha interna também chamada labirinto é formada por escavações no osso temporal, revestidas por membrana e preenchidas por líquido. Limita-se com a orelha média pelas janelas oval e redonda. O labirinto apresenta uma parte anterior relacionada com a audição, a cóclea ou caracol, e uma parte posterior relacionada com o equilíbrio, constituída pelo vestíbulo e pelos canais semicirculares (RUSSO, 1999).

Segundo Zemlin (2000), à medida que cada vibração sonora penetra na cóclea, a janela oval move-se para dentro lançando o líquido da escala vestibular numa profundidade maior dentro da cóclea. A pressão aumentada na escala vestibular desloca a membrana basilar, uma superfície rígida composta por 20 a 30 mil fibras que se estende por todo o comprimento da cóclea. Perto da janela oval, as fibras são curtas e rígidas, mas à medida que vão para a outra ponta dos tubos, estas fibras ficam mais longas e flexíveis, permitindo haver frequências ressoantes diferentes. Dessa forma, as células ciliares de diferentes regiões da cóclea estimulam diferentes alturas do som, sendo interpretadas pelo cérebro da seguinte forma: em virtude do comprimento maior e rigidez menor das fibras presentes na base da cóclea, as ondas sonoras de alta frequência (sons agudos) vibram as fibras mais próximas da janela oval, e ondas sonoras de frequência mais baixa (sons graves) vibram as fibras mais próximas da outra ponta da membrana, a porção superior ou ápice da cóclea.

A vibração da membrana basilar faz com que as células ciliares do órgão espiral de Corti, estrutura que contém milhares de pequenas células ciliares que fica na superfície da membrana basilar e se estende por toda a cóclea, se agitem para frente e para trás. As movimentações dos cílios os flexionam nos pontos de contato com a

membrana tectórica (tectorial), que se apóia sobre os cílios das células externas. A flexão dos cílios excita as células sensoriais e gera impulsos nas pequenas terminações nervosas filamentosas da cóclea, que enlaçam essas células (ZEMPLIN, 2000).

Esses impulsos são então transmitidos através do nervo coclear até os centros auditivos do tronco encefálico e córtex cerebral. A percepção da intensidade do som se dá pelo grau de energia da movimentação das fibras basilares, que é dependente da amplitude da onda sonora. Sons fortes transportam uma maior energia provocando movimentação das fibras basilares com mais intensidade. Assim as células ciliares sensitivas são estimuladas e na mesma intensidade forte, maior é o número de estímulos transmitidos ao cérebro. Esse dado é usado pelo cérebro para interpretar o grau de intensidade de um determinado som. Dessa forma, a energia hidráulica é convertida em energia elétrica. No entanto, o fenômeno biológico que permite que o sistema nervoso humano adquira as sensações sonoras a partir de impulsos nervosos ainda não está completamente elucidado (RUSSO, 1999).

1.2.1 Equilíbrio

Zemlin (2000) e Russo (1999) relataram que o labirinto posterior ou vestibular, constituído pelos canais semicirculares e pelo vestíbulo, é responsável pelo equilíbrio corporal. Os canais semicirculares correspondem a três pequenos tubos, em forma de semicírculo, que contém líquido, e estão colocados, respectivamente, em três planos espaciais (um horizontal e dois verticais) no labirinto posterior, em cada lado da cabeça.

O vestíbulo é uma grande cavidade, entre os canais semicirculares, cheia de líquido – a perilinfa. Quando a cabeça é movimentada, a perilinfa se desloca dentro dos canais. O deslocamento desse líquido estimula nervos específicos, que enviam ao

cérebro informação sobre a posição do corpo em relação ao ambiente e ao espaço. O cérebro interpreta a mensagem e comanda os músculos que, em resposta, atuam na manutenção do equilíbrio do corpo, independente da posição em que se encontra (RUSSO, 1999).

1.3 Perdas Auditivas

Perda auditiva é a falta da habilidade em captar ou interpretar o som. Pode variar desde a dificuldade em ouvir sons suaves, entender a fala e até a impossibilidade de perceber sons de forte intensidade, (RUSSO, 1999). O Quadro I contém a classificação das perdas auditivas quanto a sua etiologia, época de manifestação e localização.

Quadro I. Classificação das perdas auditivas segundo a diversidade de variáveis clínicas a elas associadas e internacionalmente reconhecidas.

PERDAS AUDITIVAS	Etiologia	Ambiental	Genética	
		Pré-Natal	Sindrômica	
		Pós-Natal	Não sindrômica	
		Peri-Natal	-	
	Época de Manifestação	Pré-Lingual	Pós-Lingual	
		Antes da aquisição da Linguagem	Após aquisição da linguagem	
	Localização	Tipo	Grau	
	Orelha Externa e/ou Média	Condutiva	Leve à Moderada (26 à 40 dB)	
	Orelha Interna	Sensorial	Leve à Profunda (26 à > 90 dB)	
		Neural	Leve à Profunda (26 à > 90 dB)	
Orelha Média e Interna	Mista	Leve à Severa (26 à 90 dB)		

1.4 Testes Genéticos na Intervenção Precoce

O exame de Emissões Otoacústicas (EOA), também conhecido como o “Teste da Orelhinha”, é um dos diversos exames que avalia a integridade da função auditiva. É realizado pelo Fonoaudiólogo em recém nascidos, utilizando um equipamento digital, gerador de estímulos sonoros com o objetivo de verificar o bom funcionamento da cóclea. O teste pode detectar precocemente a perda auditiva, que deverá ser confirmada, subsequentemente, por exames audiológicos mais apurados (SBF, 2011). Com a aprovação do Projeto de Lei nº 12.303 de 02 de agosto de 2010, que determinou a realização gratuita do exame em todas as crianças nascidas em hospitais e maternidades do território nacional, um grande avanço foi promovido no processo de detecção precoce da Perda Auditiva.

O exame de EOA indica que o bebê pode apresentar um problema de audição, mas não identifica a sua etiologia. Pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) tem mudado esta realidade. Sob a coordenação da pesquisadora Dra. Edi Lúcia Sartorato, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG)¹, foi desenvolvido um método que permite detectar a principal causa da Perda Auditiva de origem genética, uma mutação, denominada 35delG no gene da proteína conexina 26 (13q11–q12). O teste genético desenvolvido pela equipe do CBMEG tem sido apontado como uma ferramenta imprescindível no diagnóstico precoce da perda auditiva. A proposta é realizá-lo no ato do teste do pezinho, em que no momento da retirada de sangue será coletada também, em um papel absorvente, uma amostra para o exame genético.

A perda auditiva sensorineural não síndrômica apresenta-se como um desafio para clínicos, audiologistas e geneticistas; por não ser acompanhada de características

¹ Notícia veiculada pelo Jornal da Unicamp online de 3 a 9/11/2008, Ano XXIII – nº 445.

físicas que apontem para transmissão genética, podendo ser de difícil e demorado diagnóstico etiológico, sendo necessário que se tenha um alto grau de suspeita clínica e obtenção de informações fiéis e adequadas sobre membros da mesma família (GODINHO *et al.*, 2003).

1.5 Epidemiologia das Perdas Auditivas

A *American Speech–Language–Hearing Association* afirma que a perda auditiva representa 60% dos distúrbios da comunicação. A incidência da perda auditiva é alta, quando comparada às outras doenças passíveis de triagem ao nascimento, como algumas doenças metabólico-hormonais analisadas pelo teste do pezinho, incluindo o hipotireoidismo, a anemia falciforme e a fenilcetonúria. O Grupo GATANU, em 2009, indicou que a incidência da PA chegou a ser 30 vezes maior que a da fenilcetonúria. Estimativas empíricas indicam também que a taxa de perda auditiva é de 30:10.000 e para fenilcetonúria é de 1:10.000. Nos programas de saúde preventiva é frequente a perda auditiva ser a mais prevalente dentre as deficiências congênitas rotineiramente triadas (GATTO e TOCHETTO, 2007).

Nos países desenvolvidos aproximadamente 1:1000 crianças apresentam perda auditiva de algum grau, sendo 60% dessas de etiologia genética (SMITH e CAMP, 1999; OMS 2000; MESOLELLA *et al.*, 2004; PIATTO *et al.*, 2005; TEEK *et al.*, 2010). Ainda para Smith, Hildebrand e Camp (2010), 1:500 recém nascidos apresentam perda auditiva permanente e bilateral ≥ 40 dB. No Brasil, a perda auditiva varia de 2 a 7 em cada 1000 crianças nascidas vivas (SARTORATO e GUERRA, 2002).

Segundo Cryns *e col.* (2004) e Mahdieh *e col.* (2010), aproximadamente 1:500 ou 1:650 crianças nascidas, apresenta perda auditiva, fazendo assim, com que a perda

auditiva seja a mais frequente alteração sensorial. Mais de 50% dos casos de perda auditiva tem origem genética (SMITH e CAMP, 1999; SARTORATO e GUERRA, 2002; MESOLELLA *et al.*, 2004; PIATTO *et al.*, 2005; PARGARKAR *et al.*, 2006; ALVES e RIBEIRO, 2007; MAHDIEH *et al.*, 2010; TEEK *et al.*, 2010). A maior parte das perdas auditivas é recessiva e não sindrômica (SMITH, HILDEBRAND e CAMP, 2010).

Da população mundial com idade inferior a 15 anos, aproximadamente 62 milhões têm perda auditiva permanente. Destes dois terços (41 milhões) habitam países em desenvolvimento. Em neonatos a incidência de perda auditiva varia de 1,5 a 5,95 por 1000 nascimentos (GATTO e TOCHETTO, 2007). A *Hearing Loss Organization* (HLO) refere que, nos Estados Unidos da América, 28 milhões de americanos apresentam algum tipo de perda auditiva, desde aquela que envolve apenas a compreensão de fala até a perda auditiva total. A HLO estima que o número de PA duplique até 2030 (SILVA *et al.*, 2006).

No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no Censo 2000, constatou-se que existiam aproximadamente 24,5 milhões de pessoas com deficiência no território nacional, ou seja, 14,5% da população total da época, sendo a perda auditiva considerada a 2ª maior deficiência do Brasil e a primeira em termos sensoriais. Da população declarada com perda auditiva, 3,4% relataram incapacidade ou alguma dificuldade de ouvir. Os dados do IBGE indicaram, ainda, que o Estado de São Paulo apresentava a menor prevalência de deficientes (11,35%) e o Estado da Paraíba, a maior (18,75%).

Um estudo de base populacional, inédito no Brasil e na América Latina, foi conduzido em Canoas (RS), um município com aproximadamente 200 mil habitantes.

Os resultados indicaram perdas auditivas leves em 19,3% das pessoas entrevistadas e perdas auditivas incapacitantes em 6,8% da população (GATTO e TOCHETTO, 2007).

A perda auditiva pode se manifestar isoladamente ou fazer parte de um variado fenótipo de diferentes síndromes (NAKATA, 2000). Aproximadamente 90% das crianças portadoras de perda auditiva de grau severo e profundo são filhos de pais ouvintes (NORTHERN e DOWNS, 1991).

Segundo o *Joint Committe on Infant Hearing*, devido ao impacto negativo importante no desenvolvimento da população infantil se faz obrigatório, baseando-se nos conhecimentos atuais, a detecção precoce da perda auditiva, especialmente nos três primeiros meses de vida. Portanto, é imprescindível a instalação de um programa nacional de triagem para a perda auditiva, para garantir um atendimento apropriado antes dos sexto mês de vida (FUNDAÇÃO OTORRINOLARINGOLOGIA, 2009). Na impossibilidade da Triagem Universal, o Comitê sugere, no mínimo, usar os fatores indicadores de alto risco para a perda auditiva, apesar de estes fatores ajudarem a identificar apenas 50% das PA congênitas significativas (ROSLYNG-JENSEN, 1997).

Em países desenvolvidos, a perda auditiva hereditária ocorre em cerca de 60% dos casos. Nos casos restantes, a perda auditiva é adquirida em 30% dos casos e é idiopática em 10%. As formas não sindrômicas das perdas auditivas são responsáveis por 70% dos casos de etiologia hereditária e as sindrômicas por 30% desses. Em relação às formas de herança, a condição autossômica recessiva é a mais frequente ocorrendo em 75% a 85%, a herança autossômica dominante em 12% a 13% e ligada ao X ou mitocondrial por 2% a 3% para o grupo dos casos de perda auditiva não sindrômica (PIATTO *et al.*, 2005; ALVES e RIBEIRO, 2007).

No Brasil, a maioria dos casos de perdas auditivas são devido a fatores ambientais (SARTORATO e GUERRA, 2002), sendo que em 80% estão as infecções

congênitas, principalmente pelo vírus da rubéola, a anóxia perinatal, icterícia e a meningite e os outros 20% são fatores hereditários (SILVA-CORDEIRO *et al.*, 2010). Em um estudo realizado em Salvador (BA) com 53 crianças o principal fator etiológico da perda auditiva foi rubéola materna com 32% dos casos, seguido de meningite, 20% causas idiopáticas, 15%, prematuridade, 9% entre outros (SILVA e LIMA, 2006). Estima-se que o impacto dos fatores ambientais na causa da perda auditiva tende a diminuir, uma vez que políticas públicas de prevenção estão sendo implementadas. Sendo assim, torna-se ainda mais importante a observação das causas hereditárias e idiopáticas da perda auditiva, relacionadas com alterações genéticas nas famílias e nos surdos, que tendem a aumentar progressivamente (HOFFMAN *et al.*, 2008).

Uma mutação específica (35delG) no gene *GJB2* que codifica a proteína conexina 26 é a mais frequente na perda auditiva hereditária não sindrômica (PFEILSTICKER *et al.*, 2004). As conexinas são proteínas transmembranares que realizam comunicação celular. Nas perdas auditivas recessivas, DFNB, já descritas, a mutação 35delG é responsável pela maioria (60% a 85%) dos alelos mutantes na população caucasiana (SILVA-CORDEIRO *et al.*, 2010; PAGARKAR *et al.*, 2006).

Por ser a mutação *GJB2* (conexina 26) a causa mais comum de PA não sindrômica, o primeiro teste a ser realizado na investigação dos casos de perda auditiva deve ser o da conexina 26 (ALVES e RIBEIRO, 2007), contribuindo para confirmar ou excluir suspeitas etiológicas.

Estudos de várias partes do mundo têm documentado a incidência de mutações no gene *GJB2* em indivíduos portadores de perda auditiva, atingindo uma porcentagem de 50% de todos os casos de perda auditiva autossômica recessiva pré-lingual, incluindo populações da França, Itália, Espanha, Reino Unido, Estados Unidos, Israel, e mais recentemente, Líbano, Grécia, Áustria, China, Brasil e Palestina (KELLEY *et al.*, 1998;

GREEN *et al.*, 1999; SOBE *et al.*, 2000; MUSTAPHA *et al.*, 2001; FREI *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002; PAMPANOS *et al.*, 2002; SHAHIN *et al.*, 2002).

Em 2007 foi realizado, em 1.856 recém-nascidos, um rastreamento da mutação 35delG, em 10 cidades de diferentes regiões do Brasil. O objetivo foi verificar variações da frequência desta, nas composições étnicas do Brasil. Foram encontrados 25 indivíduos apresentando esta mutação, sendo que não ocorreram diferenças regionais significativas no estudo (SCHIMIDT e TOCHETTO, 2009).

1.6 Aspectos Genéticos da Perda Auditiva

O primeiro estudo sistemático relacionado à perda auditiva congênita aconteceu em 1853, em Dublin, conduzido por Sir William Wilde, que observou que a consanguinidade entre os pais aumentava as chances para a ocorrência desta patologia. Em 1858, o caso de três irmãos com perda auditiva congênita e retinite pigmentosa foi descrita por Albrecht Von Graefe, um oftalmologista alemão. Estas mesmas alterações foram mais tarde identificadas em várias famílias, por Charles Usher, que as classificou como uma condição hereditária (GODINHO *et al.*, 2003).

Segundo Morton (2002), apesar da compreensão da base genética da perda auditiva ter fascinado geneticistas e médicos durante décadas, apenas recentemente genes e mecanismos moleculares subjacentes à perda auditiva começaram a ser descobertos. Devido aos avanços da genética tem sido possível localizar e isolar genes cujas mutações afetam a eficiência do sistema auditivo (SMITH e CAMP, 1999).

O interesse pelo mapeamento dos genes responsáveis por perdas auditivas tornou-se multidisciplinar, envolvendo profissionais de diferentes áreas, tais como:

Fonoaudiologia (audiologistas), Medicina (otorrinolaringologistas e pediatras) e Genética (pesquisadores em genética molecular). O mapeamento dos genes responsáveis pela perda auditiva de herança autossômica recessiva era considerado muito difícil por causa da extrema heterogeneidade genética combinada à ausência de critérios clínicos que permitissem diferenciação fenotípica entre indivíduos portadores de lesões da orelha interna causadas pelos diferentes genes (LEON, 1992; MORTON, 2002; MAGNI, 2007). Adicionalmente outros fatores complicadores impuseram dificuldades na compreensão da perda auditiva de origem genética, com destaque para o impacto das diferentes mutações nos diversos genes relacionados, o comportamento social próprio da comunidade surda, que apresenta casamentos preferenciais entre surdos além da susceptibilidade diferencial de cada indivíduo (SARTORATO, 2008).

Perda auditiva não síndrômica –PANS– ocorre quando a PA congênita é um sintoma isolado, sendo que elas são responsáveis por 70% das perdas auditivas genéticas. Os outros 30% acontecem quando a perda auditiva está associada a outros sintomas, quando então é referida como perda auditiva síndrômica – PAS, (GODINHO, *et al.*, 2003).

A Perda Auditiva genética não síndrômica pode envolver herança autossômica dominante ou recessiva. Internacionalmente referida DFN (*Nonsyndromic Deafness*) e nomeada de acordo com sua herança: DFNA para perda auditiva autossômica dominante e DFNB para perda auditiva autossômica recessiva e DFNX para perda auditiva ligada ao X. Os números que seguem as siglas designam a ordem em que o gene foi mapeado (GODINHO, *et al.*, 2003; SMITH, HILDEBRAND e CAMP, 2010).

O mapeamento do primeiro gene para perda auditiva não síndrômica de herança autossômica dominante, o *DFNA1* foi feita em 1992, por Leon e colaboradores, que destacaram o papel do gene ligado ao cromossomo 5q31. Por outro lado, o primeiro

gene identificado para perda auditiva não sindrômica de herança recessiva, o *DFNBI*, foi o *GJB2* localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q11–q12) por Guilford e colaboradores em 1994, mediante a análise de ligação em duas famílias consanguíneas da Tunísia, que apresentavam perda auditiva profunda e pré-lingual (KELSELL *et al.*, 1997; ZELANTE *et al.*, 1997; KELLEY *et al.*, 1998; BATISSOCO, 2009). Guilford (1994) e Magni (2007) afirmam que o gene *DFNBI* corresponde ao da Conexina 26 (*GJB2*). Já Sartorato e Guerra (2002) e Piatto (2005) acrescentam que ele se expressa na cóclea, mas sua função não é ainda conhecida com precisão.

O gene *GJB2* (*proteína junção gap*), localizado no braço longo do cromossomo 13 codifica a proteína conexina 26 (Cx26). Mutações em *GJB2* estão envolvidas tanto nas formas dominantes quanto recessivas de perda auditiva não sindrômica que é a principal causa de perda auditiva pré-lingual genética não sindrômica hereditária. Dentre as perdas auditivas DFNB, já descritas até o momento, a mutações no gene *GJB2* mais frequentemente envolvida é a 35delG, que corresponde a perda de uma base Guanina da sequência de DNA, responsável pela maioria dos alelos mutantes observados na população caucasiana. A mutação 35delG ocorre em cerca de 65% a 80% das mutações encontradas no gene *GJB2* (PFEILSTTICKER *et al.*, 2004; SILVA–CORDEIRO *et al.*, 2010). A perda auditiva em decorrência desta alteração é tipicamente congênita, não progressiva e de moderada a profunda (ALVES e RIBEIRO, 2007). Sendo assim, esta mutação apresenta-se como o primeiro marcador indicado para análise molecular em famílias que apresentam perda auditiva sensorineural, por ser fácil seu rastreamento e bastante eficiente ele se torna extremamente importante para o aconselhamento genético (PIATTO, 2003).

Várias mutações têm sido descritas no gene *GJB2*, potencialmente associados à perda auditiva autossômica recessiva pré-lingual em até 50% dos casos e em várias

populações. É indiscutível o impacto destas mutações nas Perdas Auditivas Genéticas Não Síndrômicas e sua importância significativa no aconselhamento genético. A mutação 35delG tem sido uma das mais estudadas, e sua prevalência em deficientes auditivos é expressiva em diversas populações da Europa Mediterrânea e tem sido observada, com frequência nesse locus, em heterozigose, sendo o único alelo mutante detectado mesmo após o sequenciamento de toda a região codificadora do gene *GJB2*. A prevalência de heterozigosidade nas populações tem sido de 10% a 42% (ZELANTE *et al.*, 1997; GUALANDI *et al.*, 2002; ESTIVILL *et al.*, 2005).

Estima-se que mais de 400 *loci* gênicos possam contribuir para a perda auditiva síndrômica e acredita-se que por volta de 100 genes possam estar envolvidos com a perda auditiva não síndrômica (SARTORATO, 2002).

Metade dos recém-nascidos com perda auditiva congênita autossômica recessiva não síndrômica, severa a profunda ou profunda, têm mutações no gene *GJB2* que codifica a conexina 26 (Kelsell, 1997; Nivolin *et al.*, 2010; Pfeilsticker *et al.*, 2004; Cryns, 2004), tendo sua incidência variável, entre as diferentes populações (ZELANTE *et al.*, 1997; SMITH, HILDEBRAND e CAMP, 2010).

Os genes *GJB2*, *GJB6* e *GJA3* ocorrem em agrupamentos, estando todos localizados no cromossomo 13, como a maioria dos genes de conexinas (MAGNI, 2007). Com a evolução dos estudos genéticos relacionados à perda auditiva, o mecanismo da audição tem sido desvendado, tornando possível a identificação frequente de genes associados ao fenótipo da perda auditiva (YANG *et al.*, 2010). O Quadro II indica alguns genes de conexina associados à perda auditiva.

Quadro II. Principais genes e conexinas relacionados à perda auditiva. Adaptado de Rabionet *et al.*, 2002.

Gene	Localização Cromossômica	Conexinas
<i>GJB1</i>	Xq13.1	Cx 32
<i>GJB2</i>	13q11–q12	Cx 26
<i>GJB3</i>	1p35.1	Cx 31
<i>GJB4</i>	1p35.1	Cx 30.3
<i>GJB5</i>	1p35.1	Cx 31.1
<i>GJB6</i>	13q12	Cx 30
<i>GJA1</i>	6q21–q23.2	Cx 43
<i>GJA3</i>	13q11	Cx 46

A mutação *35delG* tem sido muito estudada e é caracterizada pela deleção de uma guanina, em uma série de seis, localizadas na posição 30–35, a partir do nucleotídeo 1, da região codificadora no exon 2 do gene *GJB2*. Por este motivo, alguns autores utilizam a denominação de *30delG* para a mesma mutação, a qual tem sido empregada indistintamente na literatura (CARRASQUILLO *et al.*, 1997; DENOYELLE *et al.*, 1997; ZELANTE *et al.*, 1997).

A proteína conexina 26 é indispensável ao funcionamento normal da orelha interna, onde pode estar associada a outras conexinas, atuando na reciclagem de íons potássio como parte de um mecanismo de transdução de sinal na orelha interna (SILVA–CORDEIRO *et al.*, 2010). Além da conexina 26 (Cx26, gene *GJB2*), outro gene associado à etiologia da perda auditiva não síndrômica autossômica recessiva foi localizado nessa mesma região cromossômica: o gene *GJB6* que codifica a conexina 30 (GRIFA *et al.*, 1999).

Há ainda fortes indícios que sugerem a possibilidade de uma herança digênica para a Perda Auditiva Genética Não Síndrômica (PAGNS). Nesse caso uma explicação tem sido proposta para a heterozigose composta, consequência de uma herança digênica, em decorrência da existência de outro gene, o *GJB6*, que codifica a conexina

30, presente no mesmo loco *DFNBI* (STEVENSON, 2003). O gene *GJB6* tornou-se um candidato óbvio por ser expresso nas mesmas estruturas da orelha interna em que o gene da conexina 26 também se expressa, além de ambas as conexinas serem funcionalmente relacionadas. Duas grandes deleções foram identificadas no gene *GJB6*, as quais têm sido extensivamente investigadas em diversas populações (DEL CASTILLO *et al.*, 2002 e 2005). O fenótipo da perda auditiva em decorrência de mutações no *GJB2* caracteriza esta perda como pré-lingual, profunda e não-progressiva (BERNARDES *et al.*, 2006).

Piatto e col. (2005) fizeram uma revisão de alguns genes já descritos que, quando mutados, ocasionavam as mais diferentes formas de perdas auditivas, não sindrômicas dominantes ou recessivas, ligadas ao X ou as mitocôndrias. Dentre as referidas, observaram as mutações nos genes das Miosinas, proteínas não convencionais com alteração nos cromossomos 11(11q13.5). Mais de 70 genes estão descritos relacionados à perda auditiva de herança autossômica recessiva. Os dados sobre os Genes e a localização podem ser obtidos online na *Hereditary Hearing Loss Homepage*.

2. Justificativa

Devemos cuidar de dar um passo à frente, um passo, por menor que seja.
Anônimo

A perda auditiva (PA) é o déficit sensorial mais comum em humanos, conseqüentemente, gera alterações na estruturação da linguagem e na capacidade de comunicação oral (TEEK *et al.*, 2010; HOFFMANN *et al.*, 2008). Uma em cada mil crianças nasce surda ou se tornará surda em diferentes graus antes que a linguagem seja adquirida. Outras 2 ou 4 em cada 1000 se tornarão surdas, em algum grau após adquirirem a linguagem, no período lingual, ou antes da vida adulta. Estima-se, portanto que a cada 1000 nascidos vivos, 3 a 5 crianças na população serão surdas (PETIT, 1996). As estatísticas de países desenvolvidos relatam que mais de 50% da perda auditiva na infância é atribuída a causas genéticas. Acredita-se que até a sétima década de vida, mais de 60% da população apresentará perda auditiva (GODINHO *et al.*, 2003).

A função auditiva do bebê tem seu início ainda intra-útero. O conceito em formação reconhece a voz da mãe, do pai e das pessoas próximas a ele. Nos primeiros meses de vida acontece o período crítico de desenvolvimento e maturação das funções biológicas do ser humano. Por isso, a identificação da perda auditiva e a intervenção precoce possibilitam ao indivíduo alcançar um melhor desenvolvimento da linguagem oral, da aprendizagem, da percepção e da socialização. Sendo assim, a identificação e a intervenção precoce e eficiente da perda auditiva promovem um prognóstico favorável para o sujeito, pois podem-se otimizar as estruturas neurológicas a tempo, tornando a reabilitação mais eficiente e inserindo o indivíduo surdo com mais facilidade no meio acadêmico e profissional.

A significativa incidência da perda auditiva na população pode ser considerada como um importante problema de saúde pública, trazendo graves consequências para o desenvolvimento da criança e da sociedade (PIATTO *et al.*, 2005). Atualmente o Estado e as famílias são obrigados a investir altas somas de dinheiro para a manutenção das crianças surdas. Muitos indivíduos com perda auditiva sensorineural de causa indefinida podem apresentar alterações cromossômicas determinantes de sua patologia. Exames simples e acessíveis para investigar as mutações mais comuns associadas a perdas auditivas podem esclarecer a etiologia da perda auditiva destes pacientes (PFEILSTICKER *et al.*, 2004).

Estudos referentes a fatores que se associam a perdas auditivas e suas causas podem direcionar atividades relacionadas a intervenções na atenção primária da saúde (CRUZ *et al.*, 2009). O conhecimento dos fundamentos genéticos moleculares do sistema auditivo proporcionará intervenções precoces, desenvolvimento de novas terapias (Godinho *et al.*, 2003) facilitação do aconselhamento genético e maior integração do indivíduo, com perda auditiva, na sociedade.

Exames mais refinados e disponíveis para a população, principalmente as mais carentes, são praticamente impossíveis de serem realizados em centros com poucos recursos financeiros ou sem recurso humano especializado. Desta forma, a capacitação de profissionais para o desenvolvimento técnico e para o pensamento crítico analítico aplicado somado a uma melhor elucidação da biologia dessa doença, sem dúvida resultaria em inúmeros benefícios, principalmente para a população carente e menos assistida nas diversas regiões nacionais. Adicionalmente, tais estudos poderão solidificar a geração e desenvolvimento do conhecimento técnico-científico e tecnológico na comunidade científica regional, além de garantir uma análise

epidemiológico–molecular que retrate melhor a realidade dos agravos da saúde na população em Goiás.

Por apresentar uma elevada incidência e ter graves consequências no desenvolvimento da criança, de sua família, sociedade e estado, a perda auditiva tem sido objeto de estudos e investigações em busca de alternativas que possam minimizar as consequências desastrosas nas crianças surdas (GATTO e TOCHETTO, 2007).

A perda auditiva (PA) é a desordem sensorial mais comum, sendo que a Perda Auditiva Sensorioneural (PASN) afeta aproximadamente de 1 a 3 bebês em cada 1000 recém–nascidos. Outras 2 a 4 crianças em cada 1000 se tornarão surdas antes da vida adulta. Estima–se que pelo menos 50% das perdas auditivas pré–linguais são causadas por alterações genéticas (GODINHO *et al.*, 2003), mas faltam dados epidemiológicos exatos, principalmente no Brasil e em Goiás, sobre as perdas auditivas hereditárias pré e pós–linguais, limitando a atuação das políticas preventivas desta alteração.

3. Objetivos

“Todos os caminhos são mágicos se nos levam a nossos sonhos.”
Paulo Coelho

3.1 Geral

O presente estudo teve como objetivo geral identificar regiões cromossômicas contendo desequilíbrio genômico, potencialmente associados às perdas auditivas sensorineurais não síndromicas.

3.2 Específicos

- Identificar os genes envolvidos nas regiões de ganho e perda cromossômicas, utilizando técnicas citogenético–moleculares;
- Compreender a etiologia e mecanismos biológicos envolvidos na perda auditiva não síndromica.
- Caracterizar os aspectos clínicos, laboratoriais, citogenéticos e moleculares das perdas auditivas não síndromicas;
- Contribuir para a geração de conhecimento e formação de pessoal qualificado, visando o desenvolvimento científico e tecnológico do país, sobretudo na região Centro–Oeste.

CAPITULO I

HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA EM PERDA AUDITIVA NÃO SINDRÔMICA

Machado LAA^{1,2}, de Lima VR², Muniz NTA², Silva-Filho JG², da Silva CC^{1,3,4}, da Cruz
AD^{1,3,4}

¹Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Genética – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

²Curso de Fonoaudiologia – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

³Núcleo de Pesquisas Replicon – Departamento de Biologia – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

⁴LaGene / Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular – LACEN / Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros – SES / Secretaria de Estado da Saúde – Governo do Estado de Goiás

1. Introdução

Estudos epidemiológicos estimam que no Brasil, 80% dos casos de perdas auditivas, são devido a fatores ambientais (SARTORATO E GUERRA, 2002), e os outros 20% são hereditários (SILVA-CORDEIRO *et al.*, 2010), sendo que em 70% destes casos a perda auditiva é considerada não síndrômica. Em 80% das perdas auditivas hereditárias não síndrômicas a herança é autossômica recessiva, sendo que de 10% a 20% a herança é autossômica dominante, de 2% a 3% é ligada ao cromossomo X e em apenas 1% é de herança mitocondrial. A perda auditiva sensorineural não síndrômica apresenta-se como um desafio multidisciplinar por não ser acompanhada de características físicas que apontem para transmissão genética (GODINHO *et al.*, 2003). Sendo assim, seu diagnóstico se torna mais difícil e tardio, necessitando de maiores estudos, acerca de investigações genéticas sobre perdas auditivas sensorineurais não síndrômicas.

A perda auditiva não sindrômica caracteriza-se como um distúrbio com elevada prevalência mundial, acometendo cerca de 5% das crianças em idade escolar e 10% de indivíduos adultos, sendo considerado, um dos principais fatores incapacitantes nas relações do indivíduo, visto que afeta os mais diversos aspectos da vida desta população, incluindo, comunicação, educação, relações familiares e sociais, e oportunidades profissionais (DAVENPORT, 1990; ARNOS, 1994; CRUZ, *et al*, 2009).

Os avanços da genética molecular têm permitido a identificação de genes relacionados à perda auditiva tornando realidade o diagnóstico genético, alterando o padrão de avaliação dos sujeitos e incluindo a prática do aconselhamento genético nessa área. Os benefícios do diagnóstico precoce refletem indiscutivelmente na saúde pública, sobretudo em pessoas com hipossuficiência econômica, dependentes do Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro (SILVA e LIMA, 2006; PIATTO *et al.B*, 2005).

A aplicação de testes moleculares em conjunto com os testes audiológicos pode auxiliar na diminuição do tempo de diagnóstico da P.A., uma vez que será eliminado o período entre suspeita e confirmação do diagnóstico. Tal programa poderá levar a significativa melhoria no prognóstico da reabilitação destas crianças, promovendo melhores condições comunicativas, sociais e educacionais (PIATTO *et al.A*, 2005; PIATTO *et al.B*, 2005).

A população em geral deve ser informada sobre os avanços genéticos, assim como, profissionais devem se familiarizar a respeito do aconselhamento genético, dada a sua complexidade clínica e relevância do diagnóstico. Embora os testes genéticos não possam prever o grau de perda auditiva, o conhecimento da etiologia da perda auditiva permitirá aos profissionais da área, o aconselhamento genético apropriado, que permite avaliar os riscos da ocorrência ou recorrência de uma futura criança afetada. O diagnóstico precoce, para um tratamento adequado antes dos seis meses de idade,

proporciona maiores chances do desenvolvimento da fala e linguagem, minimizando os impactos na redução da qualidade de vida desses pacientes (ARNOS, 1994). Após a identificação do gene *DFNA1* no cromossomo 5q31, cerca de 70 loci diferentes já foram mapeados (STEEL e BUSSOLI, 1999). Estima-se que mais de 400 loci gênicos possam contribuir para a perda auditiva sindrômica e que aproximadamente 100 genes possam estar envolvidos com a perda auditiva não sindrômica (SARTORATO e GUERRA, 2002).

Pacientes com perda auditiva congênita autossômica recessiva não sindrômica, severa a profunda, podem apresentar mutações no gene *GJB2* que codifica a conexina 26 (KELSELL *et al.*, 1997; PFEILSTTICKER *et al.*, 2004; NIVOLIN *et al.*, 2010). Em um único locus, o gene *DFNB1*, é responsável pela metade dos casos de perda auditiva congênita, com incidência variável entre as populações. Os genes *GJB2* e *GJB6* são os responsáveis pelos casos de perda auditiva autossômica recessiva, que codificam as proteínas Conexina 26 e 30, respectivamente (ZELANTE *et al.* 1997).

Silva–Cordeiro e col. (2010) apontam a Conexina 26 como sendo indispensável ao funcionamento normal da orelha interna, onde pode estar associada a outras conexinas, atuando na reciclagem de íons potássio como parte de um mecanismo de transdução de sinal na orelha interna. A maioria dos genes que codificam as conexinas ocorre em agrupamentos como nos genes *GJB2*, *GJB6* e *GJA3*, todos localizados no cromossomo 13.

Segundo Da Silva (2010), as técnicas de hibridação comparativa de genomas (CGH) permitem investigar perdas e ganhos de sequência de DNA no genoma inteiro com resolução 2–3 ordens de magnitude maior do que a citogenética clássica. O uso da técnica de CGH na pesquisa acelerou o passo de descobertas na genética humana. A alta resolução oferecida pela técnica vem sendo usada para definir regiões gênicas

supostamente responsáveis por doenças humanas, tornando então uma ferramenta potente para investigar malformações nas quais a etiologia ainda é desconhecida. Como as aberrações cromossômicas são frequentemente associadas a anomalias congênitas e dismorfismos, essas alterações também estão envolvidas na etiologia da perda auditiva hereditária não sindrômica.

Os ganhos tecnológicos em citogenética molecular têm contribuído para melhorar a compreensão das alterações genéticas de tumores, retardo no desenvolvimento e de outras patologias, sobretudo para a caracterização da relação entre possíveis estágios precursores das doenças, assim como, para a identificação de regiões genômicas que possam conter genes candidatos (KESER *et al.*, 2008).

2 Material e Métodos

2.1 Grupo Amostral

No período de maio de 2010 a fevereiro de 2011 foram convidados 45 pacientes, da Clínica Escola de Fonoaudiologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, com perda auditiva sensorineural sem etiologia definida, com ou sem antecedentes familiares e sem características sindrômicas, para participarem desta pesquisa.

Os indivíduos e/ou responsáveis, receberam informações sobre os objetivos deste estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido pós-informação e responderam individualmente a anamnese com respeito à história individual para confirmar os critérios de inclusão e exclusão.

Na anamnese foram abordadas questões sobre gestação, parto, antecedentes familiares, época do diagnóstico da perda auditiva (PA), uso de Aparelho de Amplificação Sonora Individual (AASI) e Implante Coclear (IC), tipo de linguagem utilizada, escolaridade entre outros. Nesta primeira etapa, foram excluídos 3 pacientes, que durante a entrevista esclareceram a etiologia da PA. Outros 3 pacientes não compareceram para a anamnese e/ou assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Após esta etapa, todos os indivíduos foram submetidos à avaliação audiológica, sendo que, 3 indivíduos foram excluídos por apresentarem PA mista e outros 2 não compareceram nas sessões agendadas para avaliação auditiva, impossibilitando a coleta dos dados e da amostra biológica. Adicionalmente, outros 3 foram excluídos do estudo, pois 2 não compareceram no dia agendado para coleta sanguínea e 1, apesar de comparecer para a coleta, não possibilitou a realização da mesma.

Após todas as exclusões, o grupo de estudo foi constituído por 31 indivíduos de ambos os sexos, pacientes da Clínica Escola de Fonoaudiologia da PUC Goiás, que

preencheram todos os critérios de inclusão e exclusão, previamente estabelecidos para execução desta pesquisa. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEP–PUC/GO) em pesquisa com seres humanos, sob o protocolo nº

2.2 Avaliação Audiológica

Após assinatura do TCLE e Anamnese, os voluntários realizaram avaliação auditiva, no Laboratório de Audiologia da Clínica Escola de Fonoaudiologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Os participantes foram submetidos inicialmente à meatoscopia, seguida da avaliação auditiva. Nesta avaliação, as medidas de imitância acústica e a audiometria tonal limiar foram realizadas por fonoaudiólogos em cabines acusticamente tratadas. A meatoscopia foi realizada com otoscópio Welch Allyn. Os equipamentos utilizados para imitanciometria e audiometria foram o imitanciômetro AZ–7, Interacoustics e os audiômetros AC–40, Interacoustics – 2 canais e GSI 61, Grason Stadler – 2 canais.

Na meatoscopia buscou–se verificar qualquer obstrução para a passagem do som, como cera excessiva, corpos estranhos, atresia de conduto ou má formação de membrana timpânica.

Na imitanciometria, foi verificada a curva timpanométrica, a complacência estática e os reflexos acústicos estapedianos, com o objetivo de avaliar a integridade do sistema tímpano ossicular. A classificação utilizada foi a de Jerger, 1970.

Na audiometria tonal liminar pesquisou–se as frequências de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0 e 8,0 kHz, com o intuito de quantificar os limiares auditivos dos sujeitos do estudo. Para classificar o grau da perda auditiva no diagnóstico audiológico, considerou – se as orelhas individualmente, utilizando a classificação de Lloyd e Kaplan (1978). A perda auditiva foi considerada simétrica quando as orelhas do indivíduo apresentavam o mesmo grau e assimétrica quando apresentavam diferença entre os graus.

2.3 Obtenção das Amostras Biológicas

Subsequente à avaliação audiológica foi coletado no Núcleo de Pesquisas Replicon – Departamento de Biologia – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 10 mL de sangue periférico heparinizado, por punção venosa para cada participante. Após a coleta, 2 mL de sangue foram encaminhados para o Laboratório de Citogenética para a realização do cariótipo com bandeamento GTG. Os demais 8 mL de sangue foram centrifugados para a obtenção do anel leucocitário e armazenado em microtubos à temperatura de -20°C para posterior extração de DNA.

2.4 Estudo Cromossômico por Bandeamento GTG

Foram realizadas culturas de linfócitos T do sangue periférico em curto prazo, conforme os protocolos para a obtenção de cromossomos metafásicos para a avaliação cariotípica. As amostras de sangue periférico foram cultivadas em meio de cultura *RPMI-1640*® com L-glutamina (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino® (GIBCO), fitohemaglutinina® (GIBCO) e antibióticos por 48 horas. As culturas celulares foram paralisadas pela adição de colcemid® (SIGMA) à $16\mu\text{g/mL}$, seguida pela hipotonização por KCl (MERCK) à $0,075\text{M}$ e fixadas em solução álcool-ácida de Carnoy. Utilizando lâminas limpas, as amostras foram gotejadas, secas e envelhecidas para a realização do bandeamento GTG. Após o bandeamento cromossômico, as lâminas foram coradas em solução de Giemsa (GIBCO) à 4%. Para cada paciente com PA sensorineural não sindrômica foram analisadas 20 metáfases, utilizando microscopia *AxiImage2*® (CARL ZEISS / ALEMANHA) com platina motorizada, controlada pelo sistema de escaneamento de lâminas *Metafer4*® (METASYSTEMS / USA). A análise cromossômica e o pareamento dos cromossomos foram realizados utilizando o software *IKAROS*® (METASYSTEMS / USA). Após a

análise, todas as amostras e lâminas foram arquivadas no Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

2.5 Extração e Purificação do DNA

O método para a extração e o isolamento de DNA foi escolhido com a finalidade de originar DNA de alto peso molecular que consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol. Para a extração, foi utilizado o kit comercial de purificação do DNA genômico *Wizard*® (PROMEGA CORPORATION / EUA), seguindo todas as instruções do fabricante.

2.6 Hibridização Genômica Comparativa

A investigação dos desequilíbrios cromossômicos por CGH (KALLIONIEMI *et al.*, 1992) foi realizada utilizando o kit comercial para *CGH / Nick Translation*® (ABBOTT VYSIS / USA), seguindo as recomendações do fabricante. Para verificar a eficiência do processo de marcação, as amostras foram submetidas, utilizando um gel de agarose (2%) em TBE 1X, a um campo elétrico com voltagem constante de 10V/cm, por 1h. Os fragmentos de DNA com 300–1000pb foram revelados pela coloração do gel em solução de brometo de etídeo (5mg/mL). Posteriormente, a imagem foi capturada utilizando sistema de vídeo–documentação / VDS – *Video–documentation System*® (GENERAL ELECTRICS / USA). As condições de hibridação das amostras ocorreram em sistema de co–desnaturação, utilizando forno de hibridação para lâminas do tipo *Hybrite*® (ABBOTT VYSIS / USA). A Tabela I apresenta os parâmetros da hibridação das amostras.

Tabela I. Protocolo de hibridação dos fragmentos marcados por *nick translation* envolvendo a co-desnaturação em forno para lâminas

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Co-desnaturação Inicial	84±1	5 minutos	1
Anelamento	37	72 horas	1
Armazenamento	4	∞	∞

A captura das imagens foi realizada utilizando o sistema de fotomicrografia de epifluorescência *AxioImage2*® (CARL ZEISS / ALEMANHA) equipado com lâmpada de mercúrio HBO – 100W, platina motorizada e conjuntos de filtros (emissão/excitação) para fluorescência (FITC – 550/540nm, DAPI – 340/440nm e TRICT – 660/570nm) e o Software *ISIS/CGH*® (METASYSTEMS / EUA).

Na obtenção do perfil linear para CGH cromossômico, foram utilizadas no mínimo, 10 metáfases por caso. Os valores limítrofes para ganhos e perdas foram, respectivamente, 1,25 e 0,75. As perdas cromossômicas foram consideradas para os casos que apresentaram valores menores que 0,75. Os ganhos cromossômicos para os casos com valores maiores que 1,25.

As imagens dos cromossomos sobrepostos, alterações estruturais (quebras cromatídicas/cromossômicas, cromossomos em anéis, fragmentos acêntricos, cromossomos dicêntricos, dentre outras), depósitos de corante, ausência de fluorescência e o cromossomo Y foram excluídos da análise. Como controle interno da reação de CGH foi utilizado o DNA da linhagem celular *MPE600*® (ABBOTT VYSIS / USA) que apresenta um conjunto de alterações genômicas pré-identificadas que acompanha o kit de CGH utilizado neste estudo.

3 Resultados Discutidos

3.1 Estatística Descritiva do Grupo Amostral

A Tabela II apresenta o descritivo do grupo amostral utilizado neste estudo observados nos pacientes portadores de perda auditiva não síndrômica.

Do grupo amostral, 45,2% (14/31) eram do sexo masculino e 54,8% (17/31) do feminino, com idade média de 19,5 anos, sendo que 54,8% citaram antecedentes familiares de perda auditiva, 41,9% afirmaram não haver antecedentes e 3,2% não souberam informar (adoção e não há conhecimento da família biológica). Todos os participantes apresentavam perda auditiva sensorineural, dos quais 87,1% dos indivíduos referiram perda auditiva pré-lingual e 12,9% perda auditiva pós-lingual.

Tabela II. Aspectos descritivos do grupo de voluntários com perda auditiva sensorineural não síndrômica

Sexo	Média da Idade (anos)	Número de Pacientes (%)	Época de manifestação (%)		Cariótipo
			Pré-lingual	Pós-lingual	
Masculino	22,4	45,2 (14/31)	78,6 (11/14)	21,4 (3/14)	46,XY
Feminino	17,1	54,8 (17/31)	94,1 (16/17)	5,9 (1/17)	46,XX
Total	19,5	100 (31)	87,1 (27/31)	12,9 (4/31)	–

Estes aspectos permitem uma compreensão mais ampliada sobre a etiologia da perda auditiva sensorineural não síndrômica, além da sua caracterização citogenética, pelo que relatou Godinho e col. (2003), na estreita relação com a herança autossômica dominante, manifestando-se como perda auditiva pós-lingual, e com a herança autossômica recessiva como perda auditiva pré-lingual.

3.2 Achados Audiológicos

Para todos os participantes a meatoscopia mostrou-se dentro do padrão de

normalidade. Também não foram encontradas alterações na avaliação das medidas de imitação acústica.

No exame de audiometria tonal limiar o resultado encontrado em relação à simetria da perda foi de 16 (25,8%) orelhas, 8 indivíduos, com perdas assimétricas e 46 orelhas (74,2%), 23 indivíduos, com perdas simétricas.

Das orelhas testadas permitiu-se, também, constatar o grau de perda auditiva que elas apresentavam, como mostra a Tabela III.

Tabela III. Classificação das perdas auditivas quanto ao grau segundo a quantidade de orelhas testadas

Grau da perda	Quantidade de orelhas testadas
Leve	2 (3,2%)
Moderado	5 (8,1%)
Moderadamente Severo	5 (8,1%)
Severo	10 (16,1%)
Profundo	38 (61,3%)
Dentro dos padrões de normalidades com rebaixamento nas frequências de 3, 4, 6 e 8 kHz	2 (3,2%)

3.3 Padrões Cariotípicos

A análise citogenética resultou em cariótipos com normalidade cromossômica numérica e estrutural para todos os indivíduos avaliados, conforme apresentado na Tabela II. A Figura 1 indica uma metáfase e o pareamento cromossômico de um paciente do sexo masculino avaliado nesse estudo. A avaliação cromossômica permitiu a exclusão de quaisquer cromossomopatias detectáveis pela citogenética convencional utilizando o método de Bandeamento GTG.

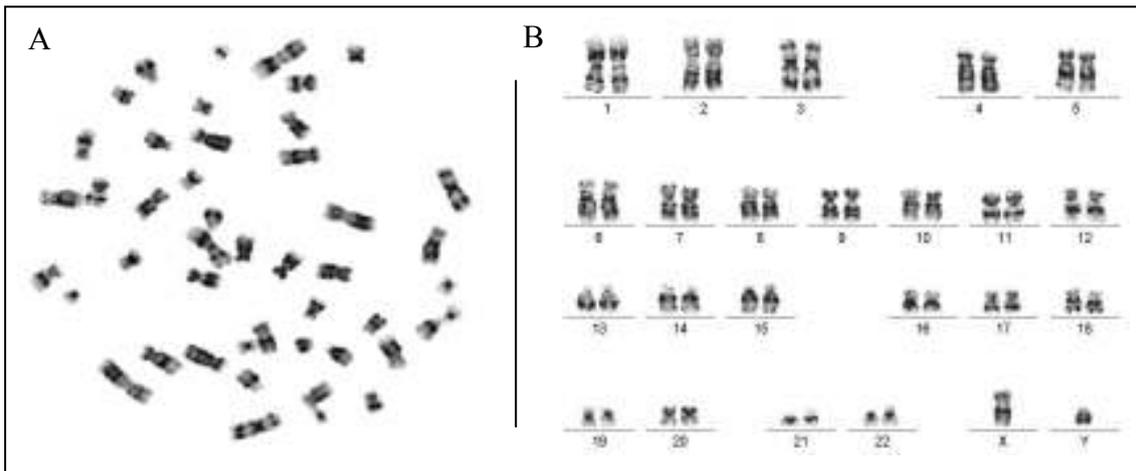


Figura 1. Cariótipo com bandeamento GTG em linfócitos T do sangue periférico de um paciente do sexo masculino (Caso No. 2329) com perda auditiva sensorioneural não síndrômica. Em [A] a metáfase e em [B] o pareamento cromossômico.

3.4 Imbalanços Cromossômicos Detectados por CGH

Nos estudos de perda auditiva não síndrômica, a técnica de CGH tem contribuído para a caracterização da relação entre possíveis estágios precusores da doença, assim como, para a identificação de regiões genômicas que podem conter genes candidatos relacionados com a etiologia da doença. Esta técnica vem sendo aplicada em uma grande variedade de doenças genéticas (DA SILVA, 2010). A Figura 2 exemplifica a hibridação genômica comparativa realizada neste estudo.

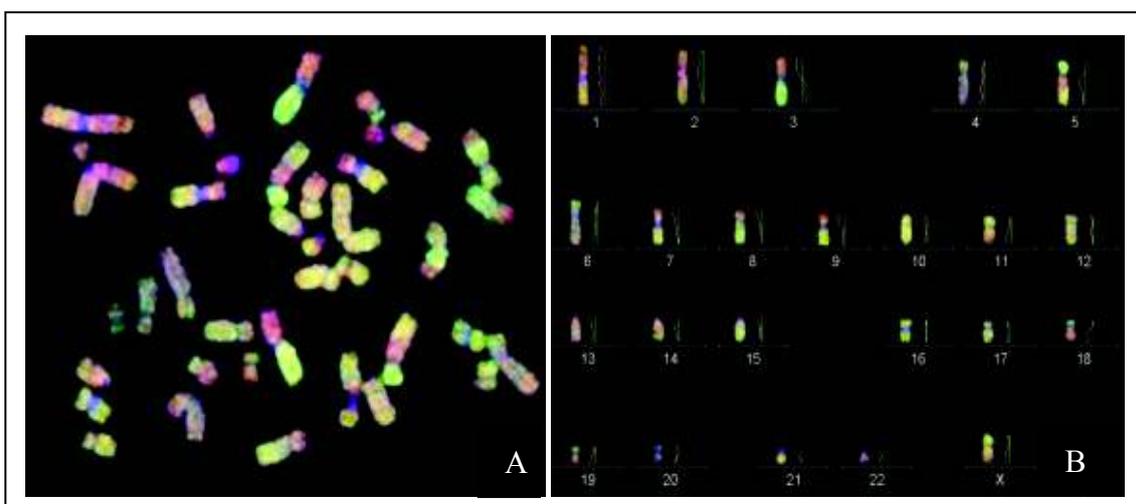


Figura 2. Hibridação Genômica Comparativa Cromossômica. Em [A] metáfase resultante da composição final de cores após a captura das imagens utilizando os filtros DAPI (azul), FITC (verde) e TRITC (vermelho). As regiões destacadas em verde e vermelho representam áreas com imbalanços cromossômicos. Em [B] o posicionamento dos cromossomos com o perfil cromossômico

A técnica de CGH, extensivamente utilizada para a identificação das alterações genéticas, permite a análise em um único experimento, de alterações do número de cópias de DNA de todo o genoma. A Figura 3 apresenta as principais regiões com imbalances cromossômicos identificados pelo CGH no presente estudo. As regiões de ganho e perda, quando comparadas com DNA referência, estão destacadas em verde e vermelho, respectivamente.

No total, foram analisados 3.349 cromossomos, com média de 108,03 cromossomos por paciente. Dos 209 imbalances cromossômicos observados, 123 (58,9%) foram referentes aos ganhos (verde) e 86 (41,1%) as perdas (vermelho), evidenciando uma diferença significativa entre eles ($p=0,021$). Os cromossomos com maior frequência de imbalances foram: o #3 (30/209) com 14,4% das alterações totais, sendo 19 (63,3%) ganhos e 11 (36,7%) perdas; o cromossomo X (19/209) com 9,1% das alterações totais, sendo 15 (78,9%) ganhos e 4 (21,1%) perdas; e o # 5 (16/209) com 7,7% das alterações totais, sendo 12 (75%) ganhos e 4 (25%) perdas.

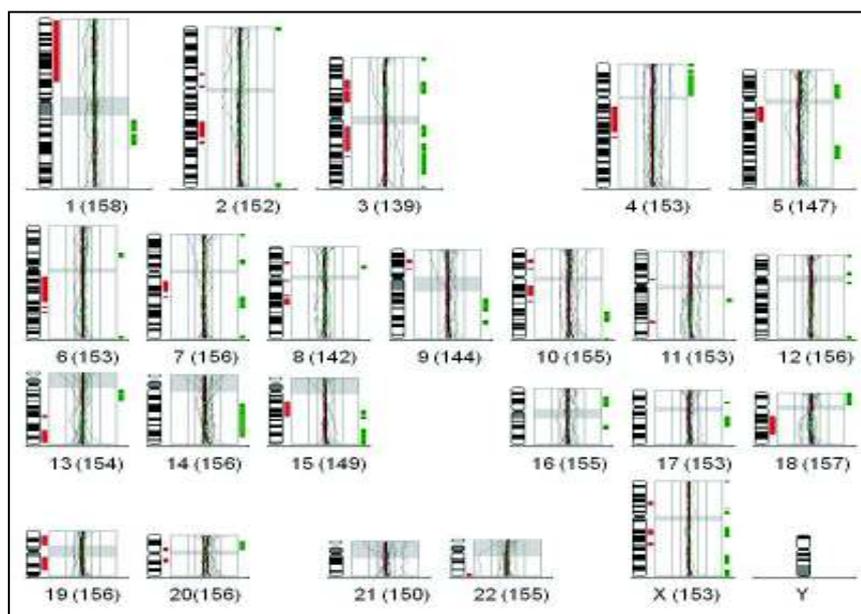


Figura 3. Imbalances cromossômicos observados em pacientes com perda auditiva sensorioneural não síndrômica. Em verde, regiões com ganhos genômicos e em vermelho, regiões cromossômicas com perdas genômicas. Os números entre parênteses representam a quantidade de cromossomos analisados.

As regiões de ganhos genômicos podem refletir a presença de segmentos extras de material genético, ocasionando um aumento de produtos protéicos os quais podem desempenhar papel no desenvolvimento da perda auditiva. Evidentemente, as perdas genômicas também podem refletir uma participação na PASNS, por interferir no equilíbrio do número de cópias no genoma e haploinsuficiência de produto protéico específico, muitas vezes ainda não descrito na literatura (NIVOLINI *et al.*, 2010). Os resultados obtidos após a análise da hibridação comparativa, envolvendo o genoma de indivíduos que apresentam perda auditiva não sindrômica, estão descritos na Tabela IV.

Tabela IV. Imbalanços cromossômicos observados em pacientes com perda auditiva sensorioneural não sindrômica pelo método de hibridação genômica comparativa, evidenciando alterações do número de cópias de DNA, incluindo regiões com ganhos e perdas cromossômicas.

Cromossomo	Regiões Cromossômicas Imbalanços Genômicos		Total
	Perdas	Ganhos	
1	1p21; 1p22.1; 1p31.1; 1p36.3; 1q21.2	1p34.2; 1p35; 1q24; 1q25; 1q31; 1q32.1; 1q32.2; 1q32.3; 1q41; 1q43	15
2	2q32.1; 2q33	–	2
3	3p12; 3p14.1; 3p14.3; 3p21.1; 3p21.3; 3p24.1; 3q21; 3q24; 3q26.2; 3q26.3; 3q29	3p25; 3q12; 3q13.1; 3q13.2; 3q13.3; 3q21; 3q22; 3q23; 3q24; 3q25.1; 3q25.3; 3q25.2; 3q25.3; 3q26.1; 3q26.2; 3q26.3; 3q27; 3q28; 3q29	30
4	4q12; 4q13.2; 4q13.3; 4q24; 4q26; 4q28; 4q31.1; 4q31.3; 4q33; 4q34; 4q35	4q27	12
5	5q11.2; 5q13.2; 5q14; 5q22	5p13; 5p13.2; 5p13.3; 5p14; 5p15.1; 5p15.2; 5p15.3; 5q31.1; 5q32; 5q33.3; 5q34; 5q35.3	16
6	6p11.1; 6p11.2; 6p12; 6q13; 6q14; 6q15; 6q16.1; 6q21; 6q22.1; 6q24; 6q25.1; 6q27	6q21	13
7	7p15.2; 7q21.1; 7q22; 7q36	7p13; 7p21; 7q21.1; 7q31.2; 7q31.3; 7q33; 7q34	11
8	8p12; 8p22; 8q11.2; 8q12; 8q24.3	8q13	6
9	9p21; 9p24	9q21.3; 9q22.3; 9q31; 9q32; 9q33; 9q34.1; 9q42.2; 9q34.3	10
10	10p11.2; 10p12.3; 10p15; 10q11.2; 10q21.1; 10q26.3	10q23.1; 10q25.1	8
11	11p14; 11q22.3	11q23.1; 11q23.3	4
12	12p13.3	12q15; 12q22	3
13	13q13; 13q21.1; 13q31	13q12.3; 13q14.3; 13q32; 13q34	7
14	–	14q22; 14q23; 14q24.3; 14q31; 14q32.1; 14q32.2; 14q32.3	7
15	15q21.2; 15q21.3; 15q26.3	15q12; 15q13; 15q14; 15q15; 15q21.1; 15q22.2; 15q22.3; 15q23; 15q24; 15q25; 15q26.1; 15q26.2; 15q26.3	16
16	–	16p11.2; 16p12; 16p13.1; 16p13.2; 16p13.3; 16q22; 16q23; 16q24	8
17	–	17p12; 17q12; 17q21.3; 17q22; 17q23; 17q24; 17q25	7
18	18q21.1; 18q21.2; 18q22	18p11.2; 18p11.3	5
19	19q13.1; 19q13.4	–	2
20	20p11.2; 20p13; 20q13.1; 20q13.3	20p12; 20p13	6
21	–	–	–
22	22q13.1; 22q13.3	–	2
X	Xp22.3; Xq26; Xq27; Xq28	Xp11.2; Xp11.3; Xp11.4; Xp21.1; Xp21.2; Xp21.3; Xq13; Xq21.1; Xq21.2; Xq21.3; Xq22.1; Xq22.2; Xq22.3; Xq24; Xq25	19

Tabela V. Regiões gênicas associadas à perda auditiva que foram identificadas por CGH cromossômico em 31 pacientes com perda auditiva sensorioneural não sindrômica, incluindo a época de manifestação da doença.

Loci	Genes	Localização	Referências	Época de Manifestação
DFNA2	<i>KCNQ4</i>	+1p34.2	Kubisch <i>et al.</i> , 1999	Pós-lingual
DFNA8/12	<i>TECTA</i>	-11q23.3	Verhoeven <i>et al.</i> , 1998	Pré-lingual
DFNA22	<i>MYO6</i>	-6q13	Melchionda <i>et al.</i> , 2001	Pós-lingual
DFNB4	<i>SLC26A4</i>	+7q31.2-p31.3	Li <i>et al.</i> , 1998	Pré-lingual
DFNB6	<i>TMIE</i>	-1p21.3-p21.1	Naz <i>et al.</i> , 2002	Pré-lingual
DFNB16	<i>STRC</i>	+15q15	Verpy <i>et al.</i> , 2001	Pré-lingual
DFNB18	<i>USH1C</i>	-11p14	Ouyang <i>et al.</i> , 2002 Ahmed <i>et al.</i> , 2002	Pré-lingual
DFNB23	<i>PCDH15</i>	-10p11.2-q21	Ahmed <i>et al.</i> , 2003	Pré-lingual
DFNB28	<i>TRIOBP</i>	-22q13	Shahin <i>et al.</i> , 2006 Riazuddin <i>et al.</i> , 2006	Pré-lingual
DFNB31	<i>WHRN</i>	+9q32-q34	Mburu <i>et al.</i> , 2003	Pré-lingual
DFNB36	<i>ESPN</i>	-1p36.3	Naz <i>et al.</i> , 2004	Pré-lingual
DFNB37	<i>MYO6</i>	-6q13	Ahmed <i>et al.</i> , 2003	Pré-lingual
DFNX2/DFN3	<i>POU3F4</i>	+Xq21.1	De Kok <i>et al.</i> , 1995	Pré-lingual

A Tabela V, acima, destaca as regiões cromossômicas com ganhos e perdas genômicas que apresentam regiões gênicas já descritas na literatura, incluindo a época da manifestação da perda auditiva. Nas regiões gênicas DFNB36 (*ESPN*), DFNA2 (*GJB3*), DFNB6 (*TMIE*), DFNA22 (*MYO6*), DFNB4 (*SLC26A4*), DFNA8 (*TECTA*), DFNB16 (*STRC*), DFNA20 (*ACTG1*), DFNB28 (*TRIOBP*) e DFN3 (*POU3F4*) foram

observados imbalances cromossômicos. Estas regiões apresentam uma associação com a perda auditiva sensorineural não sindrômica.

A metodologia da hibridação genômica comparativa permitiu observar imbalances cromossômicos em alguns loci gênicos já descritos na literatura relacionados à PASNS. Dentre outros achados, o loci DFNA2, que tem herança dominante e manifesta-se na época pós-lingual do indivíduo, DFNB6, que se manifesta na época pré-lingual e tem herança recessiva. O gene *POU3F4* (DFNX2/DFN3), com localização no cromossoma X, foi o único encontrado dentre os genes listados na literatura para este cromossomo, apresentando manifestação pré-lingual. Para que se confirme a presença de imbalances cromossômicos encontrados em relação à perda auditiva, que neste foram 15 regiões de ganho, serão necessárias novas pesquisas com este cromossomo. A Figura 4 apresenta uma visão geral do perfil de CGH cromossômico na PA sensorineural não sindrômica, evidenciando as diversas regiões cromossômicas que ainda necessitam de maiores investigações.

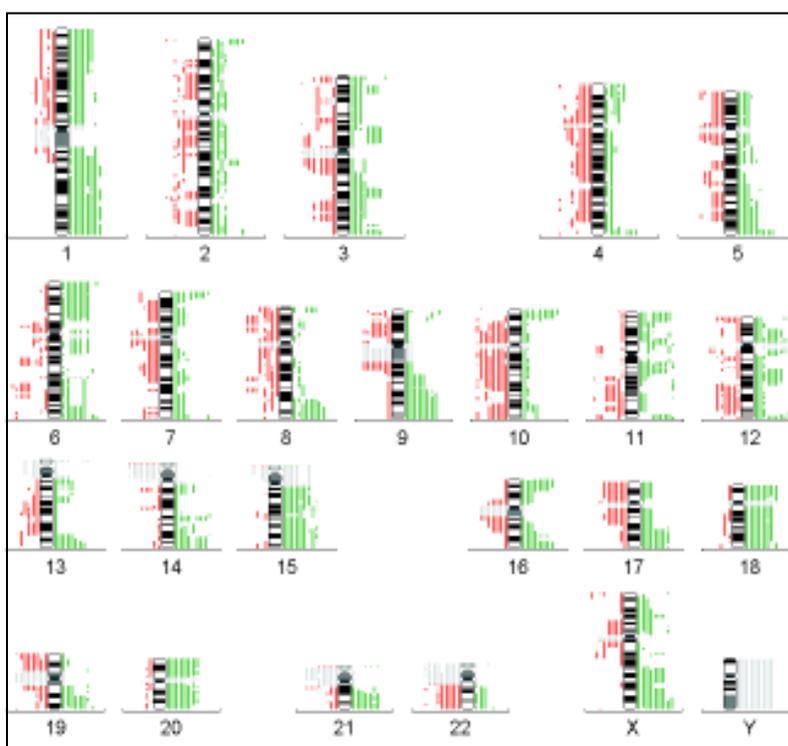


Figura 4. Perfil Linear em Barras da Hibridação Genômica Comparativa Cromossômica. Em verde, regiões com ganhos genômicos e em vermelho, regiões cromossômicas com perdas genômicas associadas à PASNS.

As alterações genômicas não se distribuíram ao acaso entre os casos estudados ($\chi^2_{31}=6,67$; $p<0,0001$). Neste sentido, não é possível atribuir uma alteração genômica específica, detectada por CGH cromossômico, para os quadros de perda auditiva. Por outro lado, os resultados refletem um significativo grupo de imbalances cromossômicos ainda não descritos como portadores de regiões gênicas que podem estar associadas à perda auditiva.

Steel e Bussoli (1999) e Sartoratto e Guerra (2002) atestam que há, ainda, uma grande quantidade de genes ainda por serem descritos e relacionados com a PA, tanto em situações síndrômicas, quanto nas não síndrômicas. Neste contexto, fica evidente uma demanda crescente de necessidade de reunir esforços para elucidar a participação dos fatores genéticos da perda auditiva.

A natureza multifatorial da perda auditiva é certamente uma situação muito evidente. Contudo, os imbalances cromossômicos assumem um papel importante na gênese e desenvolvimento da doença. Apesar de que, os ganhos (58,9%) cromossômicos superaram as perdas (41,1%), sugerindo que apenas o aumento do número de cópias do genoma, quando comparados com DNA de referência, seja o único percurso para a perda auditiva. No entanto, esta condição não parece ser correta. No final, nota-se que os ganhos ocorrem em diversas regiões cromossômicas, de maneira aleatória e sem repetição entre as 31 amostras avaliadas, enquanto que as regiões que apresentaram perdas foram mais seletivas, ocorrendo, na maioria das vezes, nas regiões cromossômicas associadas a genes já conhecidos, os quais desempenham importante papel no desenvolvimento da audição, sugerindo maior consistência de que as deleções, também sejam eventos associados com o processo da perda auditiva.

4 Considerações Finais

As diversas condições genéticas responsáveis pelo desenvolvimento da perda auditiva sensorineural não sindrômica, geralmente, estão associadas aos genes envolvidos com proteínas que regulam a formação, o crescimento e a diferenciação celular das complexas estruturas anatomorfofisiológicas que participam da audição. A identificação de marcadores relacionados ao desenvolvimento da perda auditiva seria de grande auxílio no planejamento profilático (aconselhamento genético), diagnóstico e mesmo terapêutico. Além disso, podem proporcionar uma melhor compreensão da doença e conseqüentemente o desenvolvimento de novas abordagens.

Nesta avaliação genético–molecular de indivíduos diagnosticados com perda auditiva sensorineural não sindrômica podemos observar que as regiões de imbalanços cromossômicos não estão completamente associadas ao quadro clínico observado nos pacientes.

Nos 209 imbalanços cromossômicos encontrados neste estudo apenas 13 regiões genômicas (tabela V) já foram descritas na literatura. As demais regiões genômicas, que foram identificadas com imbalanços cromossômicos ainda não foram descritas como relacionadas às perdas auditivas. Para estas situações, tornam–se necessárias novas abordagens metodológicas e investigativas para melhorar a compreensão da participação de novos genes nos processos do desenvolvimento da audição.

As técnicas de hibridação genômica comparativa têm contribuído para melhorar a compreensão das alterações genéticas em diversas situações clínicas, sobretudo para a caracterização da relação entre estágios iniciais das doenças, assim como, para a identificação de regiões genômicas que podem conter genes associados à condição investigada. Deste modo, o melhor entendimento dos papéis dos fatores genéticos nos

mecanismos relacionados com os processos de diferenciação celular, vem contribuir no melhor entendimento da gênese dos agravos à saúde, em especial, na perda auditiva.

Considera-se que a avaliação de pacientes com PA deve incluir avaliação audiológica, exame clínico, avaliação genética, história familiar, aconselhamento e suporte aos pais, ou seja, uma abordagem multidisciplinar, visando aperfeiçoar os procedimentos mais adequados para a criança (ALVES e RIBEIRO, 2007). A combinação entre a investigação de mutações , com programas de triagem auditiva será muito importante para a identificação e intervenção precoce das perdas auditivas, sendo cruciais para o desenvolvimento da comunicação (DUNCAN *et al.*, 2007; MAHDIE e RABBANI, 2009).

5 Referências bibliográficas

Ahmad S., Tang W., Chang Q., Qu Y., Hibshman J., Li Y., Söhl G., Willecke K., Chen P., Lin X. Restoration of connexin26 protein level in the cochlea completely rescues hearing in a mouse model of human connexin30–linked deafness. *PNAS* 2007; 104(4):1337–1341.

Ahmed, Z. M., Smith, T. N., Riazuddin, S., Makishima, T., Ghosh, M., Bokhari, S., Menon, P. S. N., Deshmukh, D., Griffith, A. J., Riazuddin, S., Friedman, T. B., Wilcox, E. R. Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome type IC are allelic mutations of USH1C. *Hum. Genet.* 2002; 110: 527-531.

Ahmed, Z. M., Riazuddin, S., Ahmad, J., Bernstein, S. L., Guo, Y., Sabar, M. F., Sieving, P., Riazuddin, S., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Belyantseva, I. A., Wilcox, E. R. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum. Molec. Genet.* 2003; 12: 3215-3223.

Alves, F. R. A., Ribeiro, F. A. Q. Roteiro diagnóstico e de conduta frente à perda auditiva sensorineural genética. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2007; 73(3):412-417.

American Speech-Language-Hearing Association. [Internet]. Available at: <http://www.asha.org/>.

Arnos KS. Hereditary hearing loss. *N Engl J Med.* 1994; 331: 469–470.

Batissoco A. C., Abreu-Silva R. S., Braga M. C., Lezirovitz K., Della-Rosa V., Alfredo T. Jr, Otto P. A., Mingroni-Netto R. C. Prevalence of GJB2 (Connexin–26) and GJB6 (Conne3xin–30) mutations in a Cohort of 300 Brazilian Hearing–Impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. *Ear & Hearing*, 2009; 30(1):1–7.

Bernardes R., Bortoncello S., Christiani T. V., Sartorato E. L., E Silva R. C., Porto P. R. C. Estudo molecular em crianças candidatas e submetidas ao implante coclear. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2006; 72(3):333-6.

Carrasquillo M. M., Zlotogora J., Barges S., Chakravarti A. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetics studies in isolated populations. *Hum Molec Genet* 1997; 6:2163-2172.

Colunga J. C. M., Méndez J. C. A., Villarreal J. M. C., Zapico M. J. A., Estrada C. M., Alvarez M. L. F., Díez F. G. Neonatal hearing loss screening: our results three years after starting the program. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2005; 56(2):55-8.

Cordeiro-Silva M. F., Barbosa A., Santiago M., Provetti M., Rabbi-Bortolini E. Prevalence of 35delG/GJB2 and Del (GJB6–D13S1830) mutations in patients with

non-syndromic deafness from a population of Espírito Santo – Brazil. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 2010; 76(4):428–32.

Cruz M. S., Oliveira L. R. de, Carandina L., Lima M. C. P., César C. L. G., Barros M. B. de A., Alves M. C. G. P., Goldbaum M.. Prevalência de deficiência auditiva referida e causas atribuídas: um estudo de base populacional. *Cad. Saúde Pública*; Rio de Janeiro; 2009; 25(5):1123–1131.

Cryns K., Orzan E., Murgia A., Huygen P. L. M., Moreno F., Del Castillo I., Chamberlin G. P., Azaiez H., Prasad S., Cucci R. A., Leonardi E., Snoeckx R. L., Govaerts P. J., Van de Heyning P. H., Van de Heyning C. M., Smith R. J. H., Van Camp G. A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J. Med. Genet.*, 2004; 41:147–154.

Da Silva C.C.. Avaliação Genético – Molecular do Carcinoma das Células Escamosas da Laringe. Tese do Doutorado - Universidade Federal de Goiás, 2010.

Davenport SLH. Deafness. In: Buyse ML (ed.), *Birth Defects Encyclopedia*. Dover: lackwell Scientific Publications; 1990: 488–489.

De Kok, Y. J. M., van der Maarel, S. M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A. P., Malcolm, S., Pembrey, M. E., Ropers, H.-H., Cremers, F. P. M. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science* 1995; 267: 685-688.

Del Castillo F. J., Rodríguez-Ballesteros M., Álvarez A., Hutchin T., Leonardi E., de Oliveira C. A., Azaiez H., Brownstein Z., Avenarius M. R., Marlin S., Pandya A., Shahin H., Siemering K. R., Weil D., Wuyts W., Aguirre L. A., Martín Y., Moreno-Pelayo M. A., Villamar M., Avraham K. B., Dahl H-H. M., Kanaan M., Nance W. E., Petit C., Smith R. J. H., Van Camp G., Sartorato E. L., Murgia A., Moreno F., Del Castillo. A novel deletion involving the connexin 30 gene, Del (GJB6-D13S1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin 26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet* 2005; 42:588-94.

Del Castillo I., Villamar M., Moreno-Pelayo M. A., Del Castillo F. J., Álvarez A., Tellería D., Menéndez I., Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in Nonsyndromic Hearing Impairment. *N Engl J Med* 2002; 346:243-249.

Denoyelle F., Weil D., Maw M. A., Wilcox S. A., Lench N. J., Allen-Powell D. R., Osborn A. H., Dahl Hans-Henrik M., Middleton A., Houseman M. J., Dodé C., Marlin S., Boulila-ElGaïed A., Grati M., Ayadi H., BenArab S., Bitoun P., Lina-Granade G., Godet J., Mustapha M., Loiselet J., El-Zir E., Auboïs A., Joannard A., Levilliers J., Garabédian Éréa-Noël, Mueller R. F., Gardner R. J. McK., Petit C. Prelingual Deafness: High Prevalence of a 30delG Mutation in the Connexin 26 Gene. *Hum. Mol. Genet.* 1997; 6 (12):2173-2177.

Duncan R. D., Prucka S., Wiatrak B. J., Smith R. J. H., Robin N. H. Pediatric otolaryngologists' use of genetic testing. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2007;133(3):231–6.

Estivill X., Gasparini P., Lench N. Connexin 26 (GJB2) deafness Homepage. Disponível em : [URL:http://www.iro.es/cx26deaf.html](http://www.iro.es/cx26deaf.html). Acesso em: agosto de 2005.

Frei K., Szuhai K., Lucas T., Weipoltshammer K., Schöfer C., Ramsebner R., Baumgartner W. D., Raap A. K., Bittner R., Wachtler F. J., Kirschhofer K. Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria. *Eur J Hum Genet.* 2002; 10:427-32.

Fu S., Dong J., Wang C., Chen G.. Parental attitudes toward genetic testing for prelingual deafness in China. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology,* 2010; 10:1122-1125.

Fundação Otorrinolaringologia [Internet] 2009. Available at: <http://www.forl.org.br/>.

Gatto, C. I., Tochetto, T. M. Deficiência auditiva infantil: implicações e soluções. *Rev. CEFAC* 2007; 9(1):110–15.

Gualandi F., Ravani A., Berto A., Sensi A., TrabANELLI C., Falciano F., Trevisi P., Mazzoli M., Tibiletti M. G., Cristofari E., Burdo S., Ferlini A., Martini A., Calzolari E. Exploring the clinical and epidemiological complexity of GJB2-linked deafness. *Am J Med Genet* 2002;112:38-45.

Godinho R., Keogh I., Eavey R. Perda auditiva genética. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003; 69(1):100-4.

Green G. E., Scott D. A., McDonald J. M., Woodworth G. G., Sheffield V. C., Smith R. J. Carrier rates in the mid-western United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *J Am Med Ass* 1999; 281:2211-2216.

Grifa A., Wagner C. A., D'Ambrosio L., Melchionda S., Bernardi F., Lopez-Bigas N., Rabionet R., Arbones M., Monica M. D., Estivill X., Zelante L., Lang F., Gasparini P. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nature Genetics* 1999, 23(1):16-8.

Grupo de Apoio à Triagem Auditiva Neonatal Universal [Internet] 2009. Available at: <http://www.gatanu.org/>.

Gualandi F., Ravani A., Berto A., Sensi A., TrabANELLI C., Falciano F., Trevisi P., Mazzoli M., Tibiletti M.G., Cristofari E., Burdo S., Ferlini A., Martini A., Calzolari E. Exploring the clinical and epidemiological complexity of *GJB2*-linked deafness. *American Journal of Medical Genetics* 2002; 112(1):38–45, 15.

Guilford P., Ben Arab S., Blanchard S., Levilliers J., Weissenbach J., Belkahia A., Petit C. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genetics* 1994; 6(1):24-28.

Hereditary Hearing Loss Homepage [Internet] Available at: <http://hereditaryhearingloss.org/>.

Hoffman F., Rodrigues P. F., Momensohn-Santos, T. M. M., Sartorato E. L., Maciel-Guerra A. T., Matas C. G., Moares V. C. S. Interação entre audiologia e genética no estudo de uma família: a complexidade do diagnóstico molecular e do aconselhamento genético. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 2008; 74:698-704.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. Censo 2000. Available at: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/>.

Jeger J. Clinical experience with impedance audiometry. *Arch Otolaryng.* 1970; 92:311-24.

Joint Committee on Infant Hearing Year Position Statement: Principles and Guidelines for Early Hearing Detection and Intervention Programs. *Pediatrics* 2007; (120) 4: 898-921.

Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J. W., Waldman F., Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258(5083): 818-821.

Kelley P. M., Harris D. J., Comer B. C., Askew J. W., Fowler T., Smith S. D., Kimberling W. J. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet.* 1998; 62(4):792-9.

Kelsell D. P., Dunlop J., Stevens H. P., Lench N. J., Liang J. N., Parry G., Mueller R. F., Leigh I. M. Connexin26 mutation in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature Genetics* 1997; 387:80-83.

Keser I., Toraman A. D., Ozbilim G., Guney K., Luleci G. DNA gains and losses of chromosome in laryngeal squamous cell carcinoma using comparative genomic hybridization. *Yonsei Med J.* 2008; 49(6):949-54.

Kubisch C., Schroeder B. C., Friedrich T., Lutjohann B., El-Amraoui A., Marlin S., Petit C., Jentsch T. J. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 1999; 96: 437-446.

Lélis C. N., Câmara M. F. S., Sartorato E.L. Detecção da mutação 35delG e de fatores etiológico ambientais em usuários de implante coclear. *RBPS* 2009; 22(2):69-73.

Leon P. E., Raventos H., Lynch E., Morrow J., King M. C.. The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992; 89:5181-5184.

Li X. C., Everett L. A., Lalwani A. K., Desmukh D., Friedman T. B., Green E. D., Wilcox E. R. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nature Genet* 1998; 18: 215-217.

Liu X. Z., Xia X. J., Ke X. M., Ouyang X. M., Du L. L., Liu Y. H., Angeli S., Telischi F. F., Nance W. E., Balkany T., Xu L. R.. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. *Hum Genet* 2002; 111:394-397.

Lloyd LI, Kaplan H. Audiometric interpretation: a manual of basic audiometry: Press, 1978.

Magni, C. Deficiência Auditiva Não sindrômica: Avaliação genética (genes de conexinas) e fenotípica (clínica e audiológica). Dissertação de Doutorado – Universidade Federal do Paraná, 2007.

Mahdieh N., Bagherian H., Shirkavand A., Sharafi M., Zeinali S.. High level of intrafamilial phenotypic variability of non-syndromic hearing loss in a Lur family due to delE120 mutation in GJB2 gene. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2010; 74(9):1089-1091.

Mahdieh, N., Rabbani, B. Statistical study of 35delG mutation of GJB2 gene: A meta-analysis of Carrier frequency. *Int. J. Audiol.* 2009; 48(6):363–370.

Mburu P., Mustapha M., Varela A., Weil D., El-Amraoui A., Holme R. H., Rump A., Hardisty R. E., Blanchard S., Coimbra R. S., Perfettini I., Parkinson N., Mallon A. M., Glenister P., Rogers M. J., Paige A. J., Moir L., Clay J., Rosenthal A., Liu X. Z., Blanco G., Steel K. P., Petit C., Brown S. D. Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nature Genet* 2003; 34: 421-428.

Melchionda S., Ahituv N., Bisceglia L., Sobe T., Glaser F., Rabionet R., Arbones M. L., Notarangelo A., Di Iorio E., Carella M., Zelante L., Estivill X., Avraham K. B., Gasparini P. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's Waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 69: 635-640.

Mesolella M., Tranchino G., Nardone M., Motta S., Galli V. Connexin 26 mutations in nonsyndromic autosomal recessive hearing loss: speech and hearing rehabilitation. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2004; 68:995–1005.

Morton, C. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum Molec Genet* 2001; 11(10):1229-1240.

Mustapha M., Salem N., Delague V., Chouery E., Ghassibeh M., Rai M., Loiselet J., Petit C., Mégarbané A.. Autosomal recessive non-syndromic hearing loss in the Libanese population: prevalence of the 30delG mutation and report of two novel mutations in the connexin 26 (GJB2) gene. *J Med Genet* 2001; 38(10):36.

Nakata, N. M. K. Estudo genético-clínico de 144 pacientes portadores de deficiência auditiva não sindrômica. Dissertação de Mestrado – USP, 2000.

Naz S., Giguere C. M., Kohrman D. C., Mitchem K. L., Riazuddin S., Morell R. J., Ramesh A., Srisailpathy S., Deshmukh D., Riazuddin S., Griffith A. J., Friedman T. B., Smith R. J., Wilcox E. R. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71: 632-636.

Naz S., Griffith A. J., Riazuddin S., Hampton L. L., Battey J. F. Jr., Khan S. N., Riazuddin S., Wilcox E. R., Friedman T. B. Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *J. Med. Genet.* 2004; 41:591-595.

Nivoloni K. de A. B., Silva-Costa S. M. da, Pomílio M. C. A., Pereira T., Lopes K. de C., Moraes V. C. S. de, Alexandrino F., Oliveira C. A. de, Sartorato E. L. Newborn hearing screening and genetic testing in 8974 Brazilian neonates. *Int. J. Otorhinolaryngol.* 2010; 74:926-929.

Northern J. L., Downs M. P. Avaliação auditiva comportamental. In: NORTHERN J.L., DOWNS M. P. *Audição na infância*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

Oliveira C. A., Alexandrino F., Abe-Sandes K., Silva W. A., Maciel-Guerra A. T., Magna L. A., Sartorato E. L. Frequency of the 35delG mutation in the GJB2 gene in samples of European, Asian and African Brazilians. *Hum Biol* 2004; 76(2):313-316.

Oliveira T. M. F., Vasconcellos A. M., Oliveira J. A. Diagnóstico precoce da deficiência auditiva na criança. *Temas de Pediatria*: 46, 1990.

Ouyang X. M., Xia X. J., Verpy E., Du L. L., Pandya A., Petit C., Balkany T., Nance W. E., Liu X. Z. Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non-syndromic recessive deafness. *Hum. Genet.* 2002; 111: 26-30.

Pagarkar W., Bitner-Glindziez M., Knight J., Sirimanna T. Late postnatal onset of hearing loss due to GJB2 mutations. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2006; 70:1119-1124.

Pampanos A., Economides J., Iliadou V., Neou P., Leotsakos P., Voyiatzis N., Eleftheriades N., Tsakanikos M., Antoniadis T., Hatzaki A., Konstantopoulou I., Yannoukakos D., Gronskov K., Brondum-Nielsen K., Grigoriadou M., Gyftodimou J., Iliades T., Skevas A., Petersen M. B. Prevalence of GJB2 mutations in prelingual deafness in the Greek population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002; 65:101-108.

Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nature Genetics* 1996; 14:385-391.

Pfeilsticker L. N., Stole G., Sartorato E. L., Delfino D., Guerra A. T. M. A Investigação Genética na Surdez hereditária não-sindrômica. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 2004; 70(2):182-6.

Piatto V. B., Nascimento E. C. T., Alexandrino F., Oliveira C. A., Lopes A. C. P., Sartorato E. L., Maniglia J. V. (A) Genética molecular da deficiência auditiva não-sindrômica. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2005; 71(2):216-23.

Piatto V. B., Oliveira C. A., Alexandrino F., Pimpinati C. J., Sartorato E. L. (B) Perspectivas para triagem da deficiência auditiva genética: rastreamento da mutação 35delG em neonatos. *J. Pediatr.* 2005; 81(2):139-42.

Piatto V. B. Análise Molecular do Gene da Conexina 26 em Pacientes com Deficiência Auditiva Sensorioneural Não sindrômica. Dissertação de Doutorado – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, 2003.

Rabionet R., López-Bigas N., Arbonès M. L., Estivill X. Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. 2002; 8(5):205-12.

Riazuddin S., Khan S. N., Ahmed Z. M., Ghosh M., Caution K., Nazli S., Kabra M., Zafar A. U., Chen K., Naz S., Antonellis A., Pavan W. J., Green E. D., Wilcox E. R., Friedman P. L., Morell R. J., Riazuddin S., Friedman T. B. Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *Am. J. Hum. Genet.* 2006; 78: 137-142.

Roslyng-Jensen A. M. A. Importância do diagnóstico precoce na deficiência auditiva. In: LOPES FILHO, O. Tratado de Fonoaudiologia São Paulo, Roca, 1997. p. 297-309.

Russo I. C. P, Santos T. M. A prática da Audiologia Clínica São Paulo, Cortez, 1999.

Sartorato E. L. Pesquisadores estudam mecanismos que desencadeiam surdez de origem genética: CBMEG investiga ação de gene que pode tornar pessoas mais suscetíveis à perda de audição. Campinas: Jornal da Unicamp, São Paulo, ANO XXIII, n. 415, 2008; p. 2–4. Entrevista concedida a M. Alves Filho.

Sartorato E. L., Guerra A. T. M. Genes do silêncio: a complexidade clínica da surdez genética. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2002; 68(6):903–906.

Schmidt P. M. S., Tochetto T. M. Investigação genética da surdez hereditária: mutação do gene da Conexina 26. *Rev. Soc. Bras. Fonoaudiol.*, 2009; 14(1):142–7.

Shahin H., Walsh T., Sobe T., Sa'ed J. A., Rayan A. A., Lynch E. D., Lee M. K., Avraham K. B., King M.-C., Kanaan M. Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 2006; 78:144-152.

Shahin H., Walsh T., Sobe T., Lynch E., King M.-C., Avraham K. B., Kanaan M. Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet* 2002; 110:284-289.

Silva L. P. A., Lima F. Q. I. Fatores Etiológicos da Deficiência Auditiva em Crianças e Adolescentes de um Centro de Referência APADA em Salvador–BA. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2006; 72(1):33–6.

Silva-Cordeiro M. F., Barbosa A., Santiago M., Provetti M., Rabbi-Bortolini E. Prevalence of 35 delG/ GJB2 and Del (GJB6- D13S1830) mutations in patients with non – syndromic deafness from a population of Espírito Santo – Brazil. *Brazilian Journal Of Otorhinolaryngology* 2010; 76(4):428-32.

Smith R. J. H., Camp G. V. Non-syndromic hearing impairment: gene linkage and cloning. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 1999; 49:S159–S163.

Smith R. J. H., Hildebrand M. S., Camp G. V. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. *GeneReviews – NCBI Bookshelf*, 2010.

Sobe T., Vreugde S., Shahin H., Berlin M., Davis N., Kanaan M., Yaron Y., Orr-Urtreger A., Frydman M., Shohat M., Avraham K. B. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet* 2000; 106(1):50-7.

Steel K. P., Bussoli T. J. Deafness genes, expressions of surprise. *TIG* 1999; 15(6): 207-211.

Stevenson V. A., Ito M., Milunsky J.M. Connexin 30 deletion analysis in connexin 26 heterozygotes. *Genet Test* 2003; 7:151-54.

Teek R., Kruustük K., Zordania R., Joost K., Reimand T., Möls T., Oitmaa E., Kahre T., Tõnisson N., Õunap K. Prevalence of c.35delG and p.M34T mutations in the GJB2 gene in Estonia. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2010; 74(9):1007-1012.

Van Camp G., Smith R. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <<http://webhost.ua.ac.be/hhh>> Acesso em julho de 2006.

Verhoeven K., Van Laer L., Kirschhofer K., Legan P. K., Hughes D. C., Schatteman I., Verstreken M., Van Hauwe P., Coucke P., Chen A., Smith R. J., Somers T., Offeciers F. E., Van de Heyning P., Richardson G. P., Wachtler F., Kimberling W. J., Willems P. J., Govaerts P. J., Van Camp G. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nature Genet* 1998; 19:60-62.

Verpy E., Masmoudi S., Zwaenepoel I., Leibovici M., Hutchin T. P., Del Castillo I., Blanchard S., Lainé S., Popot J. L., Moreno F., Mueller R. F., Petit C. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nature Genet* 2001; 29:345-349.

Yang I., Sughrue M. E., Han S. J., Aranda D., Pitts L. H., Cheung S. W., Parsa A. T. A comprehensive analysis of hearing preservation after radiosurgery for vestibular schwannoma. *Collections* 2011; 4:851-859.

Zelante L., Gasparini P., Estivill X., Melchionda S., D'Agruma L., Govea N., Milá M., Monica M. D., Lutfi J., Shohat M., Mansfield E., Delgrosso K., Rappaport E., Surrey S., Fortina P. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1605-1609.

Zemlin W. R. *Princípios de Anatomia e Fisiologia em Fonoaudiologia*. 4.ed. Porto Alegre; Art Med ed, 2000.

Zorzi J. Aquisição da Linguagem Infantil. São Paulo: Panscast, 1993.

Zuliani L. M. Triagem auditiva em pré-escolares da cidade de Goiânia-GO. Dissertação de Mestrado em Enfermagem em Saúde Pública - Universidade de São Paulo, 1999.